

UNIVERSITE DE LYON
FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

N° 505

**ÉTUDE DU MÉTABOLISME
ET DE L'ÉLIMINATION DU DEXTORPHAN
(d Hydroxy - 3 N - méthyl morphinan)
ÉNANTIOMORPHE DU LÉVORPHAN (DROMORAN)**

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon, Section de Pharmacie
présentée et soutenue publiquement
devant LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

le 12 Mai 1964

par

Elie MOUSSALLEM

né le 14 Septembre 1937

(LIBAN)

1964

F. ANDRE

5 rue Bugeaud Lyon

UNIVERSITE DE LYON
FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

N° 505

**ÉTUDE DU MÉTABOLISME
ET DE L'ÉLIMINATION DU DEXTORPHAN
(d Hydroxy - 3 N - méthyl morphinan)
ÉNANTIOMORPHE DU LÉVORPHAN (DROMORAN)**

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon, Section de Pharmacie
présentée et soutenue publiquement
devant LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

le 12 Mai 1964

par

Elie MOUSSALLEM

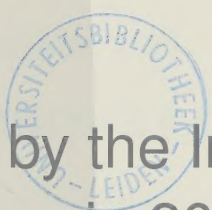
né le 14 Septembre 1937

(LIBAN)

1964

F. ANDRE

5 rue Bugeaud Lyon



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553420_0008

P E R S O N N E L D E L A F A C U L T E

Doyens honoraires :

M. J. LEPINE : Membre de l'Institut.

M. H. HERMANN: Correspondant de l'Institut. Doyen : M. J.F. CIER

Assesseurs : MM. M. LEVRAT
L. REVOL

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND, MAZEL, GARIN,
GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY, DUCLOS, GUILLEMINET, HERMANN, ROCHET.

PROFESSEURS

MM. CIBERT	Clinique urologique.
PONTHUS	Physique biologique. (détaché à Beyrouth)
DECHAUME	Clinique neuro-psychiatrique et d'hygiène mentale.
CHAMBON	Chimie organique et toxicologie.
WERTHEIMER	Clinique chirurgicale B.
PAUPERT-RAVAULT	Clinique médicale B.
FROMENT	Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires.
CROIZAT	Clinique médicale C.
ENSELME	Chimie biologique et médicale.
MALLET-GUY	Clinique chirurgicale A.
REVOL	Pharmacie galénique.
POLLOSSON	Clinique gynécologique.
PIGEAUD	Clinique obstétricale.
BOURRET	Médecine du travail.
LEVRAT	Clinique médicale A.
SOHIER	Hygiène et action sanitaire et sociale.
NETIEN	Botanique et cryptogamie.
BERTRAND	Clinique chirurgicale C.
BADINAND	Chimie analytique pharmaceutique.
DREVON	Pharmacie chimique et pharmacologie.
ROCHE	Médecine légale et déontologie.
COUDERT	Parasitologie et pathologie exotique.
MOUNIER-KUHN	Clinique d'oto-rhino-laryngologie et d'audio- phonologie.
PAUFIQUE	Clinique ophtalmologique.
THIERS	Clinique de dermatologie, syphiligraphie et allergologie.
BRUN	Clinique de pneumo-phtisiologie.
CREYSSEL	Clinique traumatologique des membres.
DARGENT	Clinique carcinologique.
GUICHARD	Anatomie pathologique.
GIRARD Paul	Pathologie générale et expérimentale

MM. LATARGET	Anatomie.
PEYCELON	Pathologie chirurgicale.
GIRARD Marcel	Thérapeutique.
VACHON	Pathologie médicale.
GALY	Physio-pathologie des voies respiratoires.
PAPILLON	Radiologie.
JEUNE	Clinique des maladies infectieuses.
GONIN	Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale.
MONNET	Bactériologie.
BANSSILLON	Physiologie et pathologie obstétricales.
CHATONNET	Physiologie B.
GUINET	Clinique endocrinologique.
TRILLAT	Clinique de chirurgie orthopédique.
FREIDEL	Clinique stomatologique.
MARION Joseph	Clinique de chirurgie et d'orthopédie infantiles.
DORCHE	Matière médicale et législation pharmaceutique.
DUMONT Louis	Histologie et embryologie
PERROT	Chimie
CIER J.-F.	Physiologie A.
PERRIN J.	Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire.
MICHAUD Pierre	Clinique de Chirurgie Cardiaque.
X.....	Clinique médicale infantile et hygiène du premier âge.
X.....	Biologie médicale et pharmacodynamie.

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

MM. BERGER	Physique nucléaire appliquée à la médecine.
BERTOYE	Bactériologie.
MANSUY	Neuro-chirurgie.
COLLET	Chimie pharmaceutique.
SARROUY	Clinique de pédiatrie.
LACROIX	Climatologie.
LIARAS	Clinique chirurgicale propédeutique.
LECUIRE	Neuro-chirurgie.
REVOL	Médecine générale.
GOINARD	Thérapeutique chirurgicale.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM. ROMAN	Parasitologie.
CIER André	Pharmacie chimique et pharmacologie.
FEROLDI	Anatomie pathologique.
MORET	Physique biologique.

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES TITULAIRES

MM. CREYSSEL Roger	Chimie biologique.
THIVOLET	Hygiène.
GARIN	Parasitologie.
PINET	Electro-radiologie.
ODDOUX	Botanique et cryptogamie.
de SOLLIERS	Chimie analytique.
TOLOT	Médecine du Travail.

MM. DESPIERRE	Médecine générale.
GUYOTAT	Neuro-Psychiatrie.
DESCOTES	Chirurgie générale.
JOUVET	Pathologie expérimentale.
PEYRIN	Physique biologique.
TOMMASI	Anatomie pathologique.
BUFFARD	Electro-radiologie.
LEJEUNE	Médecine générale et thérapeutique.
de MOURGUES F.	Stomatologie.
NAUSSAC	Maladies infectieuses.
REBOUILLAT	Chirurgie générale.
ROMAGNY	Pédiatrie.
DELAHAYE J.P.	Médecine générale.
DELEUZE R.	Anesthésiologie.
GIRAUD M.	Electroradiologie diagnostic et thérapeutique.
MICHEL	Anesthésiologie.

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES STAGIAIRES

MM. DUROUX	Anatomic.
BRETTE	Thérapeutique.
BOUCHET	Anatomic.
FAVRE-GILLY	Hématologie.
GIROD	Histologie et embryologie.
GRAS	Chimie biologique.
MALLEIN	Chimie analytique.
RIFFAT	Hygiène.
FAUCON	Biologie médicale et pharmacodynamie.
FLANDROIS	Physiologie.
VIALLIER-RAYNARD	Bactériologie.

AGREGES EN EXERCICE

MM. BURTHIAULT	Obstétrique.
FRANCOIS	Pédiatrie et puériculture.
GIGNOUX	Oto-rhino-laryngologie.
GUILLEMIN	Chirurgie générale.
JAUBERT DE BEAUJEU	Chirurgie générale.
MARION Pierre	Chirurgie générale.
PLANCHU	Médecine générale.
PONT	Médecine générale.
SAUTOT	Chirurgie générale.
TRAEGER	Médecine générale.
VIGNON	Médecine générale.
BONAMOUR	Ophtalmologie.
COLIN	Médecine légale
COLOMB	Dermatologie.
de MOURGUES Georges	Chirurgie générale.
DEVIC	Médecine générale.
DUMONT Martial	Obstétrique.
DURAND	Urologie.
FRANCILLON	Chirurgie générale.
SAUBIER	Chirurgie générale.
SCHOTT	Neuro-psychiatrie.

MM. ALLEGRE	Neuro-chirurgie.
CHASSARD	Electro-radiologie.
FAYSSE	Orthopédie.
GAILLARD	Oto-rhino-laryngologie.
GARDE	Médecine générale.
HUGONNIER	Ophtalmologie.
KALB	Pneumo-phtisiologie.
LARBRE	Médecine générale.
MARET	Chirurgie générale.
MORNEX	Médecine générale.
NORMAND	Médecine générale.
PERRIN André	Médecine générale.
BETHENOD	Pédiatrie et puériculture.
DUMAS	Stomatologie.
FRIES	Médecine générale.
GARMIER	Obstétrique.
LAMBERT	Médecine générale.
MICHOULIER	Chirurgie générale.
NOEL	Médecine générale.
ROBERT	Médecine générale.
SCHNEPP	Orthopédie.

MM. le Professeur	<u>EXAMINATEURS DE LA THESE :</u>
" "	M.CHAMBON, PRESIDENT.
" "	A.BADINAND.
" "	L.ROCHE.
" "	L.PERROT.

A MON PERE ET MA MERE

En témoignage de ma très grande reconnaissance et de mon affection.

Leur bonté et leur dévouement ont été le meilleur soutien moral durant les longues années de mes études.

Leur vie restera pour moi le plus bel exemple d'amour et de sacrifice. Que ce modeste travail les réconforte des longues années de séparation et leur assure mon très filial respect.

A MES FRERES MOUNIR ET ANTOINE

Ce travail marque la réalisation d'un de leurs chers désirs. En ce jour, je voudrais leur exprimer mon attachement et toute ma reconnaissance pour les sacrifices qu'ils ont consentis.

A MON FRERE RAMEZ

MEDECIN

L'assurance d'être toujours "coude à coude" pour la vie.

A MA BELLE SOEUR

A MES ONCLES

A MES TANTES

A MES COUSINS

A MES COUSINES

A TOUS LES MIENS

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR M. CHAMBON

Professeur de chimie organique et de toxicologie

Officier de la Légion d'Honneur

C'est lui qui nous a orienté dans le choix du sujet de cette thèse, et nous a aidé beaucoup pour la réaliser.

Il nous a toujours accueilli avec bienveillance et sympathie.

Pendant les années passées à son contact, nous avons pu apprécier sa grande bonté, son dynamisme, ses capacités de travail, et bénéficier de l'étendue de ses connaissances et de ses conseils.

Nous avons toujours vu en lui l'homme droit, méthodique, humain, dont les vertus et les principes seront un exemple dans notre carrière.

Nous tenons à le remercier de la bienveillance dont il a fait preuve à notre égard.

Qu'il veuille bien accepter le témoignage de notre respectueuse gratitude et l'assurance de notre profonde reconnaissance.

AUX MEMBRES DE NOTRE JURY

MONSIEUR LE PROFESSEUR A. BADINAND

Professeur de chimie analytique pharmaceutique
Pharmacien biologiste des Hôpitaux
Chevalier de la Légion d'Honneur

Nous avons eu le très grand plaisir de travailler sous sa direction et de bénéficier de son enseignement.

Au cours de nombreuses et profitables journées de travail accompli dans le laboratoire de la pharmacie, nous avons pu apprécier l'ambiance qu'il y suscite, grâce à sa cordialité, son enthousiasme, l'attention bienveillante qu'il accorde à chacun.

Nous garderons de lui le souvenir d'un homme qui sut rester simple, intègre, devenir et demeurer un Maître éminent.

Ses hautes capacités, ses qualités de coeur font que nous sommes fier d'avoir été un de ses élèves.

Nous sommes heureux qu'il ait accepté d'être notre juge. Nous le remercions de grand coeur et le prions de croire à notre reconnaissance et à notre fidèle et respectueux attachement.

MONSIEUR LE PROFESSEUR L. ROCHE

Professeur de médecine légale et toxicologie médicale
Médecin des Hôpitaux

Nous le remercions d'avoir bien voulu faire partie de notre jury, témoignant ainsi d'une amabilité dont nous lui sommes très reconnaissant.

...

MONSIEUR LE PROFESSEUR L. PERROT

Professeur de chimie
Pharmacien Chef des Hôpitaux

Nous sommes heureux de le compter parmi nos juges.

Il a toujours fait preuve à notre égard d'une extrême gentillesse.

Sa jovialité, sa modestie, sa bonté qui n'a d'égale que son savoir, font que nous l'admirons infiniment.

Il nous a par son enseignement, son amour du travail, de la recherche, aidé à mieux comprendre cette dernière. Nous garderons de lui le goût de la perfection.

Nous lui exprimons toute notre respectueuse reconnaissance.

A NOS MAITRES DE LA FACULTE DE MEDECINE ET
DE PHARMACIE DE LYON

A MES AMIS LIBANAIS

Ils savent tous les espoirs que nous plaçons
dans une amitié forte et agissante.

A MES AMIS FRANCAIS

Dont l'esprit fraternel et accueillant durant
les années passées parmi eux, nous a permis de
vivre en famille.

Ils ont été pour nous plus que des amis. Nous
leur souhaitons la réussite parfaite.

Qu'il nous soit permis, au début de ce travail, de rendre hommage à la FRANCE, grand pays de civilisation e t de culture.

Nous avons pu, grâce aux sacrifice de nos parents, faire nos études pharmaceutiques à Lyon.

Dans cette ville, où nous avons rencontré partout un accueil sympathique et une sorte d'adoption de la part de certaines familles, nous avons parachevé, en quelque sorte, notre formation culturelle et humaine.

Nous serons heureux de faire profiter notre pays de connaissances que nous ont inculquées nos Maîtres Lyonnais, et nous espérons rester digne de leur enseignement.

Nous garderons de nos amis français de faculté un cordial souvenir, et nous formulons le voeu de les accueillir un jour au Liban "Terre d'amitié".

I N T R O D U C T I O N

Bien que soient nombreux les médicaments dont dispose le médecin, l'analgésique hautement efficace et d'une parfaite innocuité reste à trouver.

L'Hydroxy-3-N-méthyl-morphinan, Lévorphan (Dromoran*) représente à cet égard un progrès indéniable.

Chimiquement il s'agit d'un dérivé appartenant à la série des morphinans. Apparenté à la morphine par sa configuration, il diffère de celle-ci par plusieurs détails de structure.

Nous nous sommes proposé d'étudier le métabolisme et l'élimination de ce produit qui par ailleurs pour l'un de ses antipodes optiques possède le caractère d'un stupéfiant.

Dans une première partie, nous étudierons la synthèse et la constitution de ce produit, puis les propriétés physiologiques et pharmacodynamiques principales

Dans une deuxième partie, nous examinerons les recherches antérieures effectuées sur la caractérisation et la distribution de cette substance dans l'organisme.

Notre participation personnelle visera à aborder ce problème de métabolisme, de la conjugaison, de l'élimination de cet alcaloïde, à la suite des travaux déjà effectués par l'école américaine sur la morphine et ses dérivés la lumière des travaux de notre Maître Monsieur le Professeur M. CHAMBON.

Dans un dernier chapitre de discussion, nous confronterons les conclusions de nos observations avec celles des travaux antérieurs.

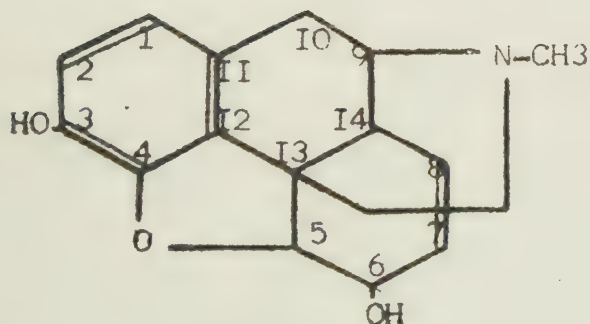
* Dromoran (nom déposé)

HISTORIQUE

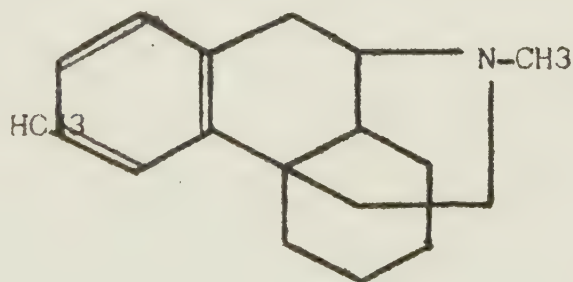
Nous connaissons actuellement la constitution, la configuration absolue de la morphine. Sa synthèse a pu être réalisée : c'était donc pour le chercheur des conditions particulièrement favorables pour tenter d'anoblir en quelque sorte cet alcaloïde en conservant ou exaltant même ses propriétés thérapeutiques utiles et au contraire en réduisant ses effets secondaires nuisibles. (34-21-48)

C'est dans ce sens que GREWE (31) synthétisa le produit dénommé par lui N-méthyl-morphinan.

A celui-ci manque quelques groupements fonctionnels de la morphine; mais il possède des propriétés analgésiques par analogie avec la morphine. Son dérivé Hydroxylé-3 dépasse de 5 fois les propriétés analgésiques de la morphine. C'est ce dérivé qui fut, à nouveau, étudié par le laboratoire HOFFMANN-LA-ROCHE à Bâle, dont nous allons examiner la synthèse :



MORPHINE



Hydroxy-3-N-Méthyl-Morphinan

PREMIERE PARTIE

GENERALITES ET TRAVAUX ANTERIEURS

CHAPITRE I

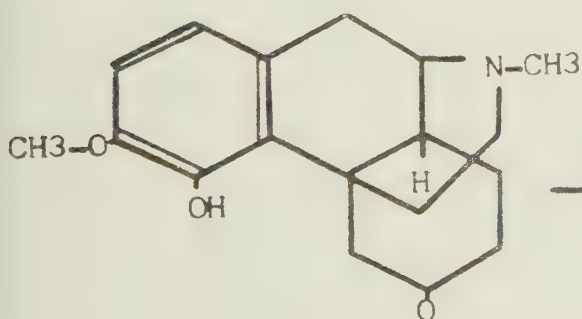
SYNTHESE

de 1'Hydroxy-3 N-Méthyl-morphinan

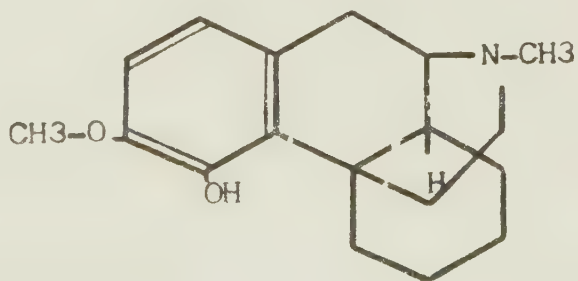
1 - SYNTHESE DE GREWE

Dans un très intéressant travail (20 -32) GREWE avait établi une méthode de synthèse des cycles de la morphine qui l'avait conduit comme première étape, à la synthèse du N-méthyl-morphinan, qui possède déjà une action analgésique du même ordre de grandeur que la morphine.

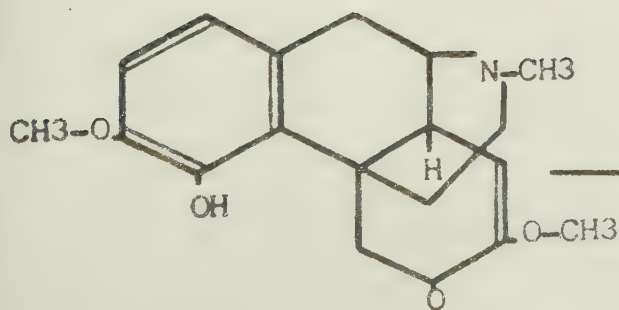
GREWE entreprenait une nouvelle synthèse de la tétrahydrodésosycoodéine, dont l'intérêt ressortait du fait que l'on connaissait un isomère dextrogyre dérivé de la dihydrothébaïne, et un autre dérivé dextrogyre pouvant être obtenu à partir de la sinoménine, alcaloïde naturel du Japon.



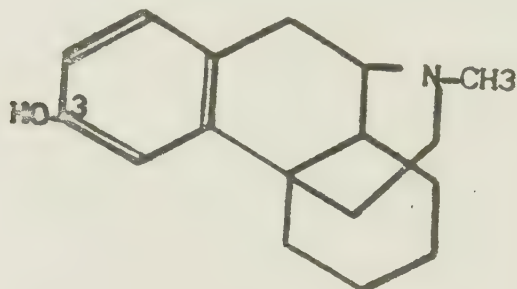
1- Tétra-Hydro-Désoxy-Isoquinoleine



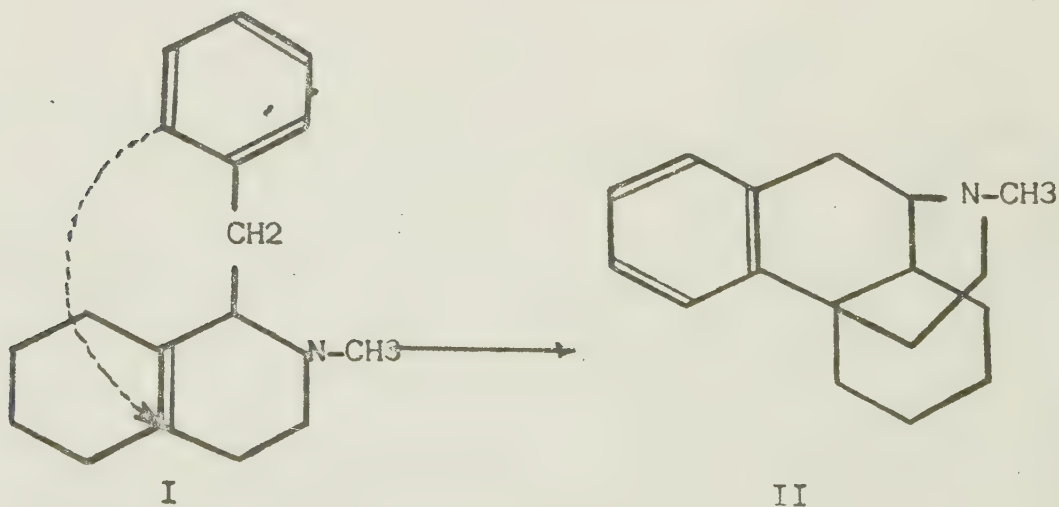
d-Tétra-Hydro-Désoxy-Isoquinoleine



Il était amené ainsi à mettre au point une nouvelle synthèse de cet intermédiaire et à préparer l'hydroxy-3 N-méthyl-morphinan.

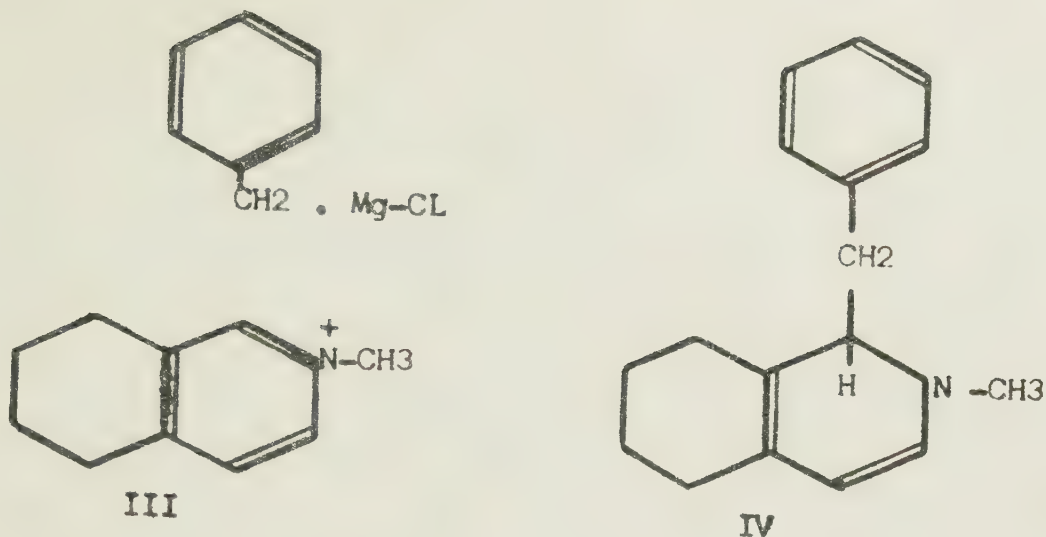


Dans un travail antérieur on a décrit une synthèse simple du système cyclique de la morphine (33) à partir de la Benzyl-1-N-Méthyl-octa-hydro-isoquinoléine (formule I) qui donne par fermeture du cycle la N-méthyl-morphinan (formule II).



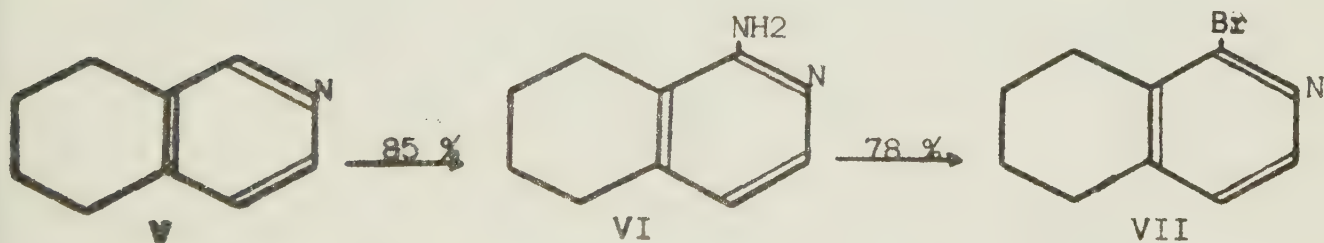
Diverses observations sur les oléfines prèchent en fait pour la transaddition souhaitée, et on peut par là présumer que la fermeture du cycle morphinan donne une ordonnance stérique exacte.

Dans le travail précédent, GREWE part du tétra-hydro-isoquinoléine-iodo-méthylate qui traité par le chlorure de benzyl-magnésium (formule III) donne la base IV (formule IV).



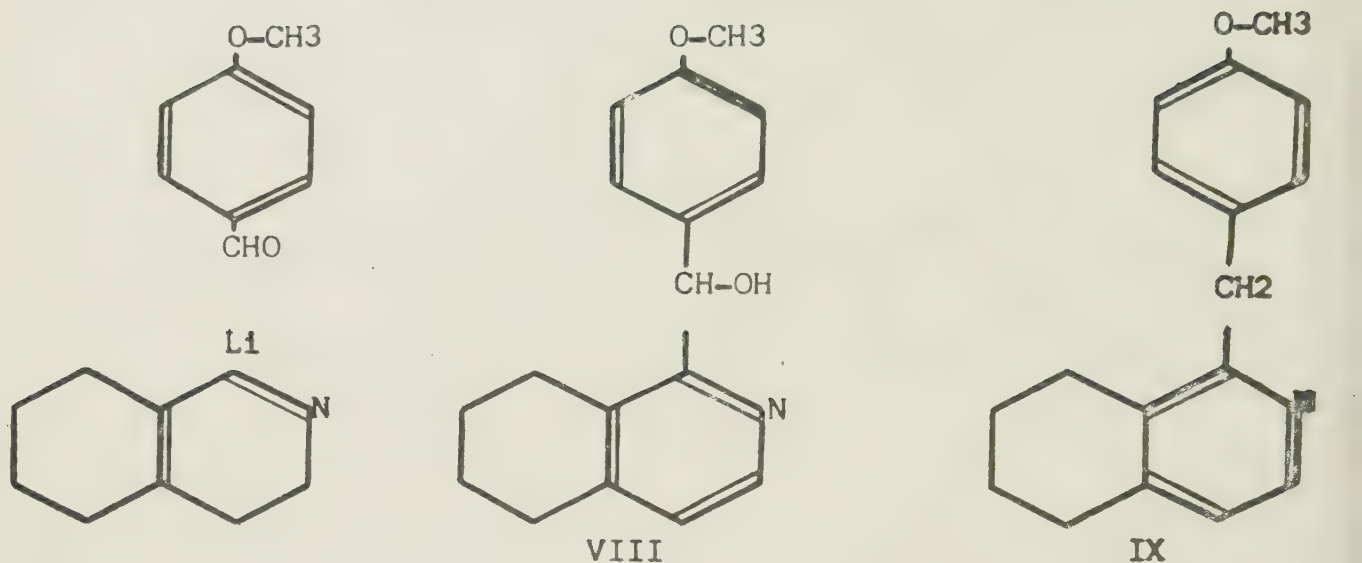
Cette dernière est réduite catalytiquement en la forme I.

Un autre procédé consiste à partir de la tétra-hydro-isoquinoléine (formule V) que l'on traite à chaud par l'amidure de sodium à préparer de l'amino-tétra-hydro-isoquinoléine (formule VI). On remplace selon la méthode de CRAIG (17) le groupe amino par le brome (formule VII) avec un haut rendement.

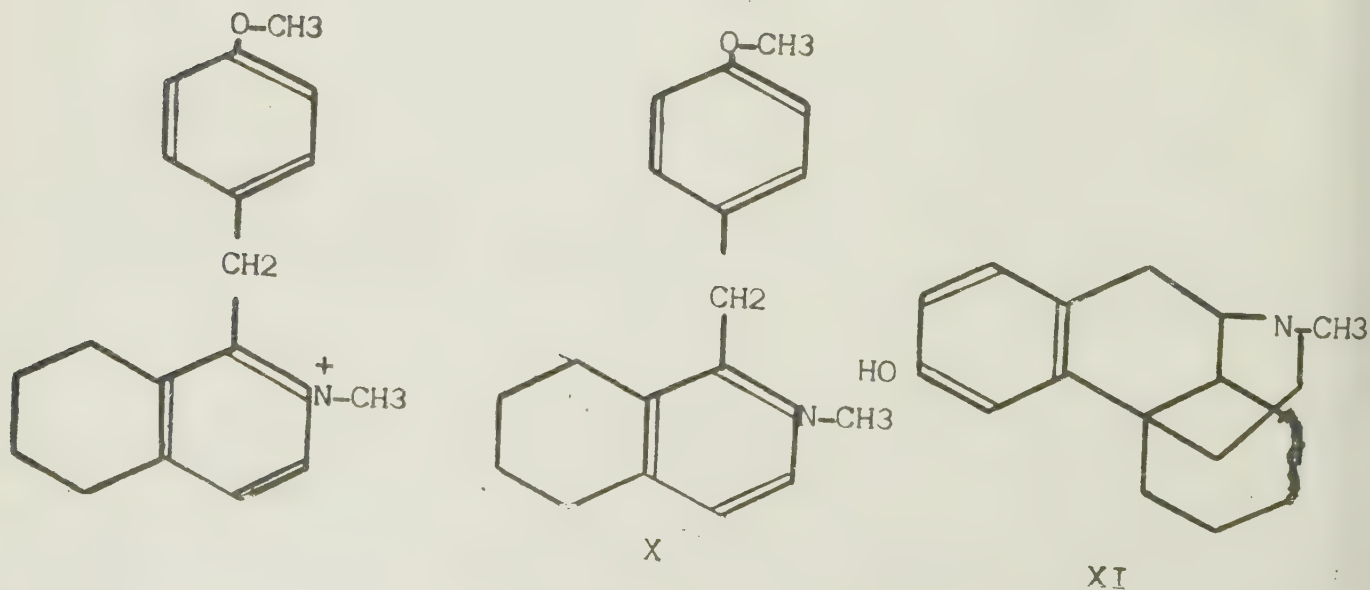


La réaction du Bromo-1-tétra hydro-isoquinoléine avec le n-butyl-lithium et l'aldéhyde anisique donne d'une façon régulière le carbinol (formule VIII).

Le moyen le plus simple pour avoir la base méthoxylé, c'est de traiter le carbinol par l'acide bromhydrique à froid pour avoir le bromure secondaire, lequel très labile est immédiatement réduit par la poudre de zinc en la forme IX (formule IX), le rendement est de 80 %.



L'addition de chlorure de méthyl se poursuit très simplement, et par hydrogénation catalytique au platine, conduit au dérivé X (formule X). Celui-ci soumis à l'action de l'acide bromhydrique à 125° pendant 6 h, pour hydrolyser le groupement méthoxylé, subit à la fois l'hydrolyse et la cyclisation conduisant à l'hydroxy-3-N-méthyl-morphinan (formule XI). Ce produit est identique à celui que donne la synthèse de SCHNIDER et GRUSSNER. Le rendement est de 30 %.



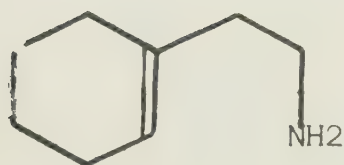
2 - SYNTHESE DE SCHNIDER ET GRUSSNER

Inspirés des travaux de GREWE, (20 - 32), SCHNIDER et GRUSSNER (64) puis SCHNIDER (67) et HELLERBACH réalisèrent dans un premier temps un 4-méthoxy-benzyl-1-isoquinoléine qu'ils cyclisent ultérieurement.

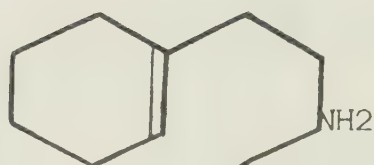
Ils partent de la cyclo-hexenyl-éthylamine (formule I) qu'ils condensent avec le chlorure de l'acide para-méthoxy-phényl-acétique (formule II) pour aboutir au para-méthoxy-phényl-acétyl (cyclo-héxényl-éthyl) amide (formule III).

La fermeture du cycle en para-méthoxy-benzyl-1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 - hexahydro-isoquinoléine (formule IV) se produit facilement en présence d'anhydride phosphorique ou d'oxychlorure de phosphore. L'huile visqueuse jaune-clair ainsi obtenue est immédiatement traitée par le bromure de méthyl ou l'aldéhyde formique concentré et hydrogénée en présence d'hydroxyde de potassium par le nickel de RANEY (formules V - VI - VII - VIII).

La troisième phase consiste à constituer le noyau phénanthrénique en cyclisant par chauffage ce dernier dérivé paraméthoxy-benzyl 1-N-méthyl 2-octahydro- 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 isoquinoléine avec de l'acide phosphorique à 100 % pendant 72 h. à 150° et conduit ainsi avec d'excellent rendement à l'obtention de l'hydroxy-3 N-méthyl morphinan. On obtient ainsi le dérivé racémique (formule IX page suivante).



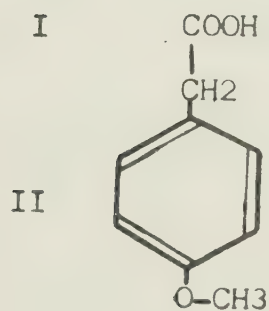
I



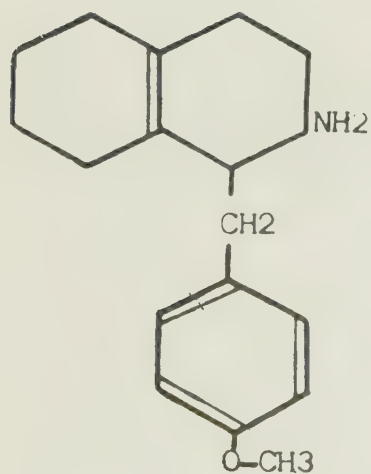
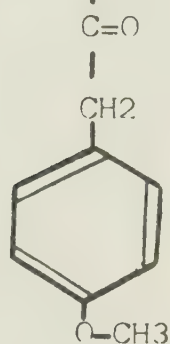
III



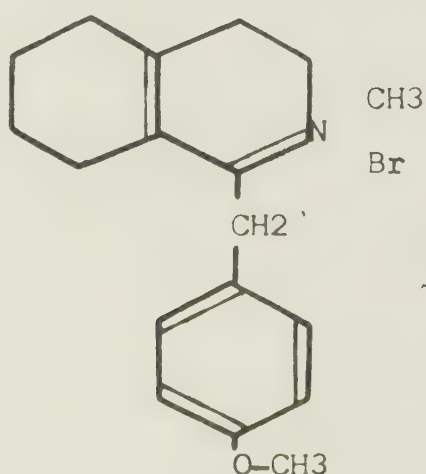
IV



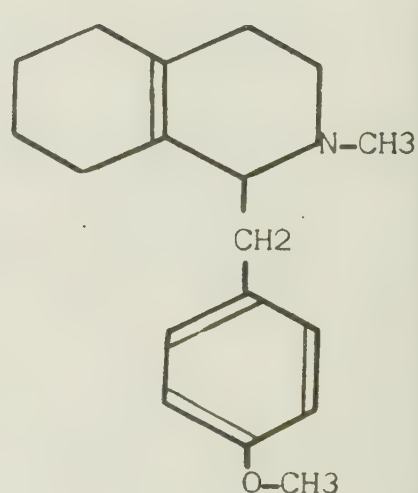
II



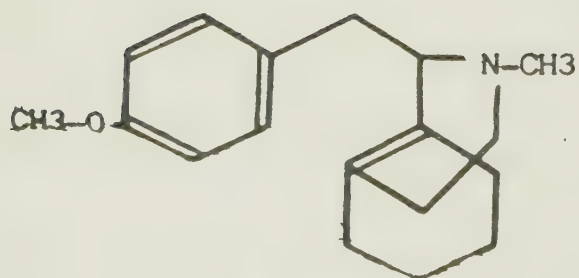
V



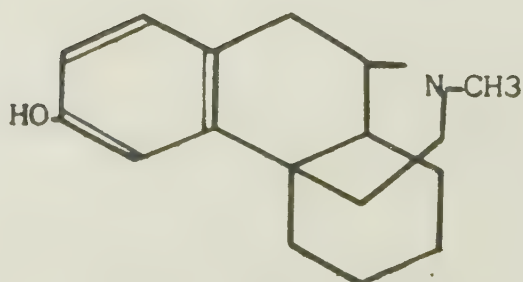
VI



VII

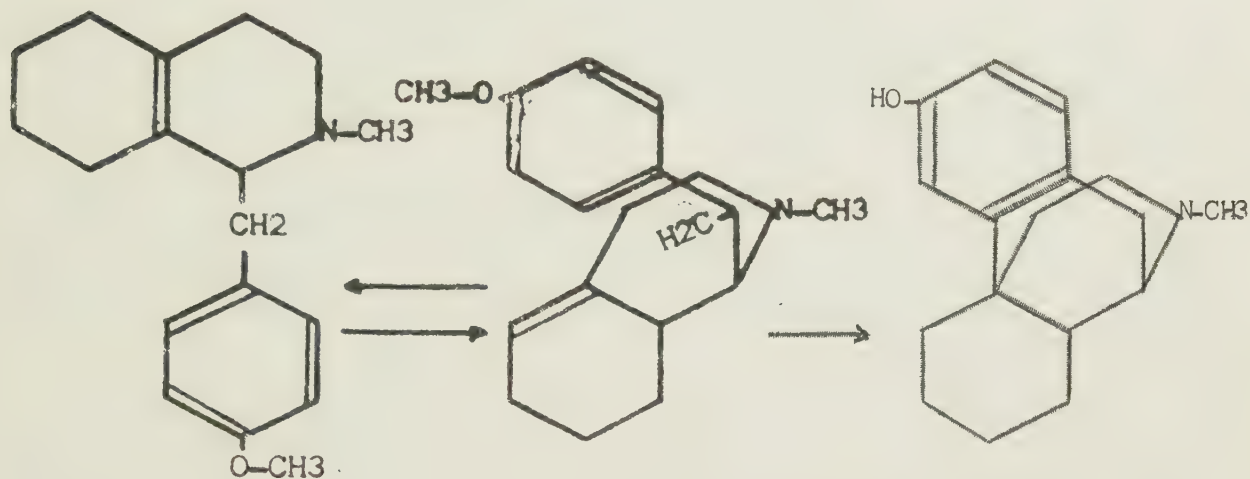


VIII

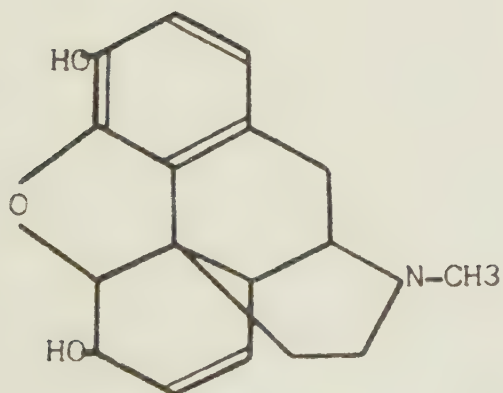


IX

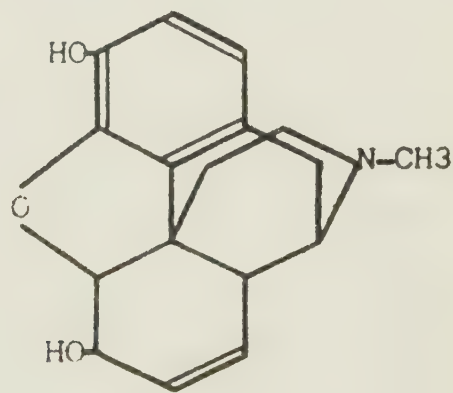
Nous pouvons présenter ces formules d'une autre façon afin de mieux distinguer le cycle Isoquinoléine. On aura la représentation suivante :



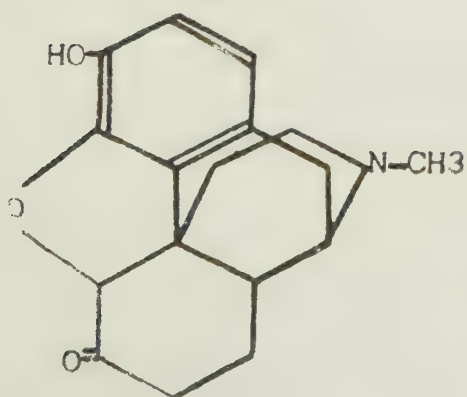
D R O M O C H A N



M O R P H I N E



E U K O D A L



D I L A U D I D

3 - OBTENTION DES ANTIPODES OPTIQUES

La synthèse de l'hydroxy-3-N-méthyl-morphinan conduit à un produit racémique. Dans son introduction en thérapeutique, il a reçu la dénomination commune de racémorphan, spécialisé initialement sous le nom de DROMORAN par les Laboratoires HOFFMAN-LA-ROCHE de Bâle, (27) nom actuellement réservé au lévorphan antipode lévogyre.

Ce racémique a été dédoublé simplement par l'acide d-tartrique. L'énantiomorphe dextrogyre ou d-hydroxy-3-N-méthyl-morphinan a reçu la dénomination commune de dextorphan, et le dérivé lévogyre ou l-hydroxy-3-N-méthyl-morphinan, Lévorphan. Le d-tartrate de l'hydroxy-3-N-méthyl-morphinan synonyme et nom déposé : Tartrate de Lévodromoran. (49)

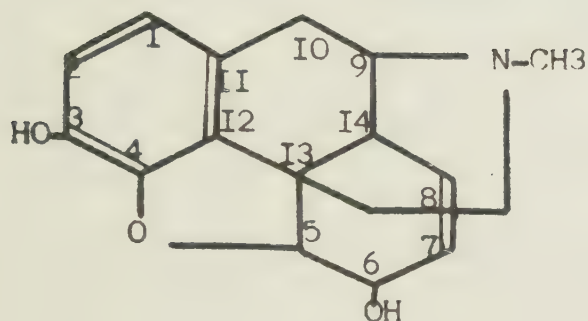
Plus récemment, on a préconisé l'emploi des dérivés du N-méthyl-morphinan méthoxylé en position 3, c'est-à-dire dans lequel l'hydroxyle du Racémorphan est méthylé; on obtient ainsi le d-l-méthoxy-3-N-méthyl-morphinan ou Lévométorphan, et enfin le d-méthoxy-3-N-méthyl-morphinan ou dextrométorphan dont le bromhydrate est plus connu sous le nom déposé de ROMILAR ou d-méthoxy-3-N-méthyl-morphinan (Laboratoire ROCHE en France).

Les deux antipodes optiques (30 - 66 - 42 - 65-82) "d" et "l" peuvent être obtenus en dissolvant le produit racémique sous forme de tartrate et en le laissant cristalliser.

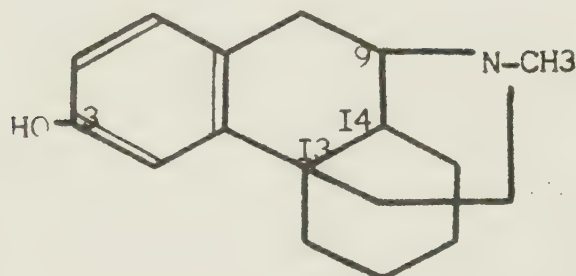
Les deux formes diffèrent par leur nombre de molécules d'eau de cristallisation.

CHAPITRE II

PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES



MORPHINE



Hydroxy-3-N-Méthyl-Morphinan

Ce dérivé du morphinan (71) diffère de la morphine par l'absence du pont oxygéné, de la double liaison en 7-8, et du groupement alcool secondaire en 6.

La formule de l'hydroxy-3-N-méthyl-morphinan possède trois carbones asymétriques 13 - 14 et 9, d'où la possibilité des isomères cis et trans.

Le bromhydrate de racémorphan se présente en poudre cristalline duveteuse blanche, de goût amer de P.F. 195-197°, soluble dans l'éthanol, partiellement soluble dans l'eau, et très peu soluble dans le chloroforme et l'éther.

La solution aqueuse à 2 % est limpide et incolore. Elle a un pH 5 - 5,6. Elle donne une coloration jaune verdâtre avec une solution de molybdate de sodium dans l'acide sulfurique, et une coloration brun jaunâtre avec un mélange de formaldéhyde sulfurique.

A 0,005 % la solution dans l'éthanol montre dans l'U.V. un maximum d'absorption à 221 m μ et 282 m μ et un minimum d'absorption à 245 m μ .

Le bromhydrate de racémorphan ne perd que 3 % de son poids à 120° pendant 4 h et ne cède que 0,1 % de cendre sulfatée. Il contient 98,5 % de produit actif (essayé par extraction, en solution alcaline avec un mélange de chloroforme et d'éther, puis réextrait par l'acide chlorhydrique et titrage de l'excès d'acide).

Le lévorphan sous forme de tartrate se présente en poudre cristalline contenant 2 molécules d'eau, inodore, de saveur amère; son P. F. 114-116°, très peu soluble dans le chloroforme et l'éther, soluble respectivement dans l'alcool et l'eau. En solution aqueuse à 0,2 % donne un pH 3,4-4.

Le dextrorphan, forme énantiomorphe, se présente en aiguilles cristallisant avec une molécule d'eau. Son P.F. 183-195° possède presque les mêmes caractères de solubilité que son isomère lévogyre.

PROPRIETES PHARMACODYNAMIQUES

Les recherches pharmacodynamiques de ces dernières années, ont été orientées vers la découverte des dérivés de certains alcaloïdes naturels ou synthétiques, dénués d'effets secondaires, tout en conservant une action efficace. Ainsi est né, nous venons de le voir, l'hydroxy-3 N-méthyl-morphinan, substituant de la morphine, spécialisé sous le nom de Dromoran.

Ce produit, tout en gardant les effets de la morphine, possède un avantage sur cette dernière. Son action analgésique montre une supériorité incontestable : c'est un agent analgésique dont l'action chez le rat est plus grande et plus durable que la morphine.

BENSON, STEFKO et RANDALL (5) ont montré l'effet séparé de cette action, par des injections s.c. de 10 mg/kg des trois formes l - d et racémique à des rats. Ces auteurs ont constaté que la forme "l" (lévorphan) montrait une activité analgésique 2 fois supérieure à celle de la morphine. Cette activité est efficace 30 minutes après l'injection et dure 60 minutes. (Fig. 1)

RANDALL et LEHMAN (62-37) ont montré aussi que le levorphan ne produit pas uniquement les effets quantitatifs de la morphine sur le rat, mais encore il a une durée d'action aussi longue que la morphine. Il est actif par voie orale et possède ainsi quelques avantages sur cette dernière. Ces auteurs ont montré aussi l'accoutumance à l'analgésie chez ces rats par administration s.c. de 3 mg/kg de Dromoran et 6 mg/kg de morphine. Ils ont constaté que cette accoutumance suit parallèlement celle de la morphine (Fig. page suivante).

L'efficacité analgésique était testée selon la méthode de HILDEBRANDT (4) sur des rats. L'auteur ne tenait pas compte du temps de la réaction, mais il mesurait la sensibilité à la douleur par la stimulation thermique par comparaison avec la morphine.

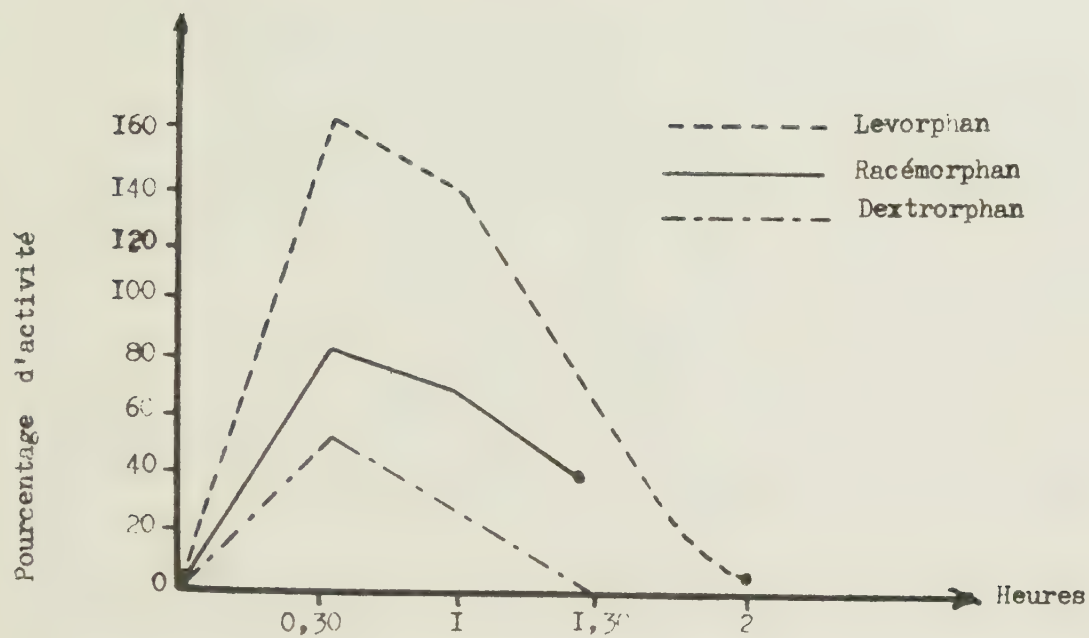


Fig : I Action Analgésique

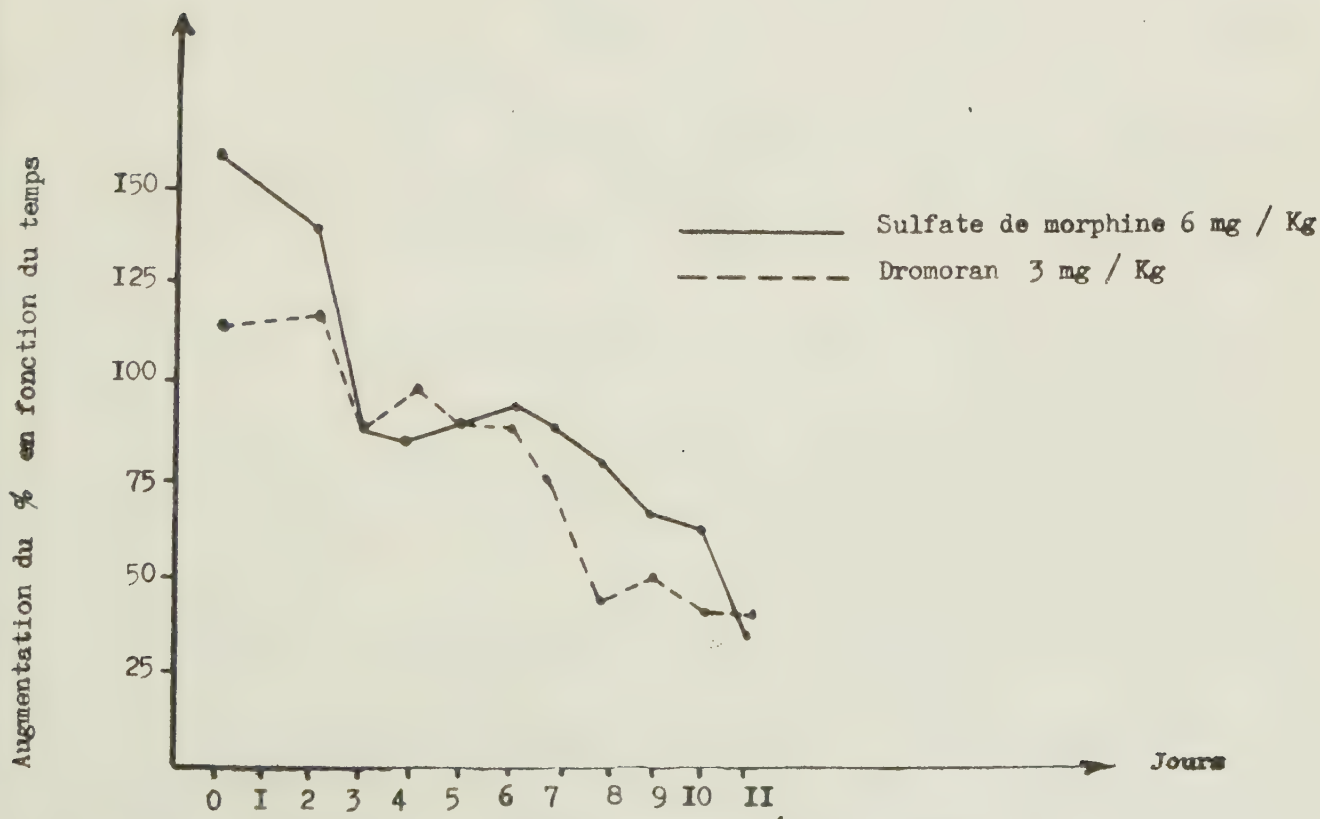


Fig : II Courbes de developement de l'accoutumance

Action analgésique : Méthode de HILDEBRANDT sur les rats

Doses en mg/kg	Précédant les injections	Plus basse température provoquant la réaction douloureuse					
		30'	60'	90'	120'	150'	210'
Dromoran							
2	56°	63°	65°	63°	60°	60°	56°
5	55°	65°	70°	70°	65°	60°	57°
10	56°	70°	70°	70°	70°	70°	
Morphine							
5	55°	57°	55°	55°			
10	55°	58°	58°	55°			
20	55°	60°	60°	58°	55°		

Des résultats obtenus on peut dire que le Dromoran est plus efficace que la morphine, car pour avoir la même stimulation il était nécessaire d'injecter la moitié de la dose correspondante à la morphine.

Il est démontré aussi que l'action dépressive du Dromoran sur la respiration est de 3 à 4 fois plus longue que la morphine.

En effet, une injection I.V. de 0,5 mg/kg de lévorphane qui correspond de 2 à 4 mg/kg de morphine donne une dépression de 40 % chez le lapin non anesthésié. Nous pouvons dire qu'à doses égales le Dromoran produit une intensité égale à la morphine, mais la durée d'action est le double.

L'action sur la pression artérielle était mesurée. A cet égard, le Dromoran a une courte action dépressive sur celle-ci. Une dose de 0,5 à 4 mg/kg en I.V. donne une pression de 10 à 40 mm de Hg après 2 à 10 minutes.

Comme la morphine, le dormoran a une action nette sur la mobilité intestinale in-vivo et sans action sur l'intestin isolé. Le spasme intestinal causé par l'acétylcholine ou l'histamine peut être compensé par des doses de Dromoran assez peu élevées. D'autre part, on observe aussi de la constipation caractéristique des produits analgésiques.

L'action propre du Dromoran sur les sécrétions peut être comparée aussi à celle de la morphine; on observe une augmentation de la sécrétion salivaire et sudorale et une diminution de la sécrétion bronchique.

Comme tout analgésique stupéfiant, nous ne pouvons pas passer sous silence sa toxicité sans parler des doses léthales. Plusieurs auteurs (62 - 41) ont étudié cette question en essayant de ressortir les effets toxiques sur différents animaux : lapins, souris, rats... Ces auteurs ont comparé la toxicité des trois formes du Dromoran : lévogyre, dextrogyre et racémique par voie I.V., s.c. et orale.

Pour mettre en évidence cette toxicité, il est nécessaire de voir d'une part la toxicité aiguë, et d'autre part la toxicité chronique.

- Toxicité aiguë

Le lévorphane, racémorphane et dextrophane en I.V., S.C. et orale.

Cette toxicité observée chez le lapin par voie I.V. et orale montre que le lévorphane est plus toxique que le dextrophane et que le racémorphane se situe entre les deux. Les LD50 étaient comparées et les doses respectives étaient de 24 - 33 et 39 mg/Kg.

Chez le rat, le lévorphane est plus toxique et la LD50 est de 110 mg/Kg en s.c. et de 150 mg/Kg par voie orale.

Ces doses donnent une augmentation salivaire, lacrymale et urinaire. Une rigidité musculaire s'installe avec des tremblements et une dépression respiratoire grave.

Chez le lapin, la LD50 du lévorphane en I.V. est de 20 mg/Kg, de 27,5 mg/Kg pour le dextrophane, et de 18,8 mg/Kg pour le racémorphane.

- Toxicité chronique

Les études de cette toxicité ont été portées chez le chien par la forme racémique, et chez le rat par la forme lévogyre.

Le tableau (page 18) illustre l'effet toxique chez le lapin, la souris et le rat par la dose létale toxique en mg/Kg des trois formes, lévogyre, dextrogyre et racémique, selon les différents auteurs. (5-27-62-38)

Ce qui est évident, c'est que l'effet léthal varie qualitativement avec les différentes espèces, dont les doses léthales sont déterminées chez ces animaux sans aucun critérium pour être applicables dans ces conditions chez l'homme.

DOSES LETHALES : TOXICITE AIGUE mg/Kg

S O U R I S			R A T			LAPIN
I.V.	S.C.	Per os	I.V.	S.C.	Per os	I.V.
L E V O R P H A N						
42 (A)	187 (A)	285 (A)	75 (B)	110 (A) 500 (B)	150 (A)	20 (A) 22,5 (B)
D E X T R O P H A N						
65 (A) 45 (B)	350 (A)	385 (A)		800 (A) 135 (B)	1100 (A)	27,5 (A) 22,5 (B)
R A C E M O R P H A N						
45 (A) 33 (C) 41 (B)	144 (A) 150 (C) 153 (D)	375 (A)		125 (A) 108 (B) 110 (D) 125 (C)	350 (A)	19 (A) 18,5 (B) 19 (C)

Références : (A = 5) (B = 27) (C = 62) (D = 38)

CHAPITRE III

CONSTITUTION ET ACTIVITE

La découverte empirique millénaire des propriétés analgésiques de l'opium, leur plus étroite localisation autour de la morphine, la détermination de la structure de cet alcaloïde sont les grandes étapes qui ont marqué la voie de la recherche, de l'étude de nouveaux analgésiques.

On conçoit les efforts des chimistes pharmacologues pour pénétrer le mystère de la constitution moléculaire fondamentale responsable de cette activité physiologique éminemment précieuse qu'est l'analgésie, c'est-à-dire l'élévation du seuil de la douleur.

A la lumière de différentes synthèses ayant conduit à la réalisation de nouveaux analgésiques efficaces, à vrai dire toutes plus ou moins inspirées de la structure de la morphine, on a essayé récemment de définir cette structure clef de l'analgésie.

Pour la morphine et les autres analgésiques morphinoïdes, on a reconnu comme typique le groupement N-méthyl-4-phényl-pipéridine, avec un atome de carbone central quaternaire. SCHAUMANN (41) voit dans cette structure le groupe "ANALGIPHORE". Pour EDDY et ses collaborateurs (19) ce n'est pas un atome de carbone quaternaire, mais plutôt un "carbone central".

Les signes de structure chimique caractéristiques pour un analgésique du type d'action de la morphine sont :

- 1) - un azote tertiaire
- 2) - un reste phényl ou un groupement isostère de celui-ci
- 3) - un pont - C - C-entre le carbone central et N
(reste hydrophyle : groupe carbonyle ou hydroxyle)

- 4) - un atome de carbone quaternaire
$$\begin{array}{c} \text{C} \\ | \\ \text{C} - \text{C} - \text{C} \\ | \\ \text{C} \end{array}$$
 ou "carbone central"

Dans la classe des morphinans, la N-méthyl-morphinan synthétisée par GREWE (32) à laquelle manque quelques groupements fonctionnels de la morphine, possède déjà des qualités analgésiques.

Mais très intéressante est la spécificité d'action des antipodes optiques. Le lévorphane (1-hydroxy-morphinan) agit comme la morphine, possède un groupement OH phénolique sur le C 3 du cycle aromatique; la combinaison 2 hydroxy correspondante n'a pas d'action analgésique. Le manque du pont éther n'apporte aucun affaiblissement de l'action analgésique, une acétylation du lévorphane conduit à une substance avec une action plus forte mais plus courte.

D'autre part, la séparation des isomères énantiomorphes : constitutifs du racémorphane, montre que l'activité analgésique est apportée uniquement par les isomères lévogyres. Mais quelques combinaisons de la série dextrogyre montrent

quelques intérêts. Par exemple : le dextrométorphan (ROMILAR) ne possède pas des propriétés morphiniques, mais bien au contraire des propriétés antitussives puissantes. (68-63)

On sait depuis longtemps combien la configuration stérique tient une place de choix dans la détermination des processus pharmacologiques.

L'ensemble montre que ce ne sont pas seulement les combinaisons CH_3 à l'azote qui ont un bon effet analgésique. Une substitution N-phényl-éthyl conduit par exemple à une substance encore plus active que le lévorphan, de même que le groupe N-phénacyl. Les plus efficaces sont les groupes N-Furyl-éthyl, N-Thienyl-éthyl et N-P-amino-phényl. Mais les groupes N-éthyl, N-benzyl n'ont pas d'effet.

De même la diminution de l'action analgésique se montre également dans l'hydroxylation des groupes aryls.

Dignes d'être mentionnées sont les combinaisons synthétisées par les chercheurs japonais de l'aza-morphinan. (79 - 39)

Tandis que N-méthyl-3-Hydroxy 6 ou 15 ou 16-aza des N-morphinan était pratiquement sans effet, la d-3-hydroxy-9-aza de N-morphinan s'est révélée comme un fort analgésique. (80 - 81) Le 7-aza dérivé a été également synthétisé.

Dans cette voie, une découverte surprenante fut l'obtention des antagonistes provenant du remplacement du groupe N-méthyl, par le groupe allyl : N-allyl-Normorphinan (Lévallorphan). Mais cet échange ne conduit forcément pas à combattre l'effet indésirable. Comme antagoniste puissant de la morphine figure actuellement le Lévallorphan (LARFAN), car 1 mg de ce dernier correspond à 10 mg de nalorphine. (28) Un intérêt particulier de ces antagonistes c'est de combattre l'effet toxique de la morphine et des morphinoïdes. L'effet sauveur des antagonistes réside dans les incidents et les tentatives de suicide avec les préparations morphiniques, car pour le médecin cela signifie une grande sécurité d'avoir à sa disposition des antipodes spécifiques.

Un autre intérêt de ces antagonistes, injectés à faible dose en s.c. provoquent en quelques minutes chez les opiomanes de fortes manifestations d'abstinence, réaction qui sert à démasquer la dépendance corporelle. Mais chez les morphinomanes chroniques l'allyl-test s'avère positif, bien que ces patients n'aient montré en aucune façon la physionomie de personnalités malades. Cependant les troubles du phénomène d'abstinence qu'ils déclenchent ne permettent pas aux antagonistes du type N-allyl d'être indiqués dans le traitement des opéomanes. (91)

CHAPITRE IV

CONSIDERATIONS STEREOCHIMIQUES

Il paraît probable en considérant les divers types de composés qui ont une activité égale ou supérieure à celle de la morphine, que la condition minimum requise peut être un groupement hydrophobe, contenant un noyau basique avec autour un arrangement spatial optimum. (3)

De plus il est possible que la configuration stéréochimique de la drogue doit être complémentaire de celle d'une certaine surface tissulaire ou d'un système enzymatique.

Le but de cette étude est de rechercher le type de mécanisme supposé "drogue-récepteur" et la nature de la surface du récepteur. L'importance de la configuration spatiale des analgésiques est démontrée chez des composés possédant un atome de C asymétrique.

Des deux énantiomorphes optiques, il est fréquent que l'un d'eux soit plus actif que l'autre, et la totalité de l'activité du mélange est la somme des activités des isomères. On peut penser que les isomères les plus actifs de chaque paire d'énantiomorphes du point de vue analgésique doivent avoir des configurations spatiales analogues. (69 - 86 - 84 - 58 - 29 - 15 - 12 - 11)

D'autre part, la différence dans l'activité biologique montrée par les isomères des paires énantiomorphes, peut être attribuée à un ou plusieurs des facteurs suivants :

- 1) - Différence dans leur distribution
- 2) - Différence dans leur taux dans leur métabolisme
- 3) - Absorption préférentielle de l'un des isomères, par un constituant optiquement actif dans l'organisme avant qu'il puisse atteindre le lieu d'action.
- 4) - Différence :
 - dans leur facilité d'absorption sur une surface réceptrice.
 - dans la nature de combinaison "drogue-récepteur".

La possibilité des trois premiers facteurs a été impliquée dans la différence d'activité pour les énantiomorphes à action analgésique faible, car il est montré par exemple (12) que la distribution de la d-méthadone et de la l-méthadone dans l'organisme est la même et que l'élimination du d, du l- et du d-l-Hydroxy N-méthyl-morphinan est identique (24).

Des indications concernant les faits qu'une surface particulière de réception est impliquée dans l'intervention de l'action analgésique d'une drogue, peuvent être aussi obtenues en considérant des antagonistes analgésiques.

La N-allyl-nor-morphine (nalorphine) s'oppose à l'action toxique des composés de structure variée : (70-61-26-87 - 40) (Morphine, Méthadone, Dromoran). En effet, une injection de nalorphine après une dose de morphine, abolit

rapidement l'action dépressive de celle-ci sur le centre respiratoire.

La substitution de groupement : allyl, méthyl-allyl, N-propyl et iso-butyl au N-méthyl de la morphine donne des composés qui combattent l'effet dépressif de cette dernière. (83 - 16)

L'hydroxy-3-N-allyl-morphinan (LARFON : non déposé; mélange racémique et isomère levogyre), s'oppose à l'action toxique de la morphine et des analgésiques synthétiques.

Les facteurs stéréochimiques impliqués dans la fixation sur la surface complémentaire réceptrice, sont de plus, accentués par les faits suivants, concernant les analgésiques antagonistes :

- 1) - La morphine et son antagoniste la nalorphine ont des configurations identiques.
- 2) - La 1-hydroxy-3-N-méthyl-morphinan (lévorphan) analgésique puissant, a comme antagoniste le 1-hydroxy-N-allyl-morphinan de configuration identique. (Lévallorphan)

On peut donc dire qu'une fixation à une surface réceptrice est impliquée dans l'action, et que les facteurs stéréochimiques sont extrêmement importants.

Les caractères communs à tous les analgésiques et leurs antagonistes (3) sont un groupement basique tertiaire (71) et une structure à cycle aromatique planiforme. Par exemple un cycle à 6 éléments possédant 3 doubles liaisons, ou un cycle à 5 éléments possédant 2 doubles liaisons.

Il est probable que ces deux groupements essentiels deviennent associés aux lieux spécifiques de réception dans une molécule repaire, représentant le stade primaire de l'action; les groupements substitués ne sont pas essentiels.

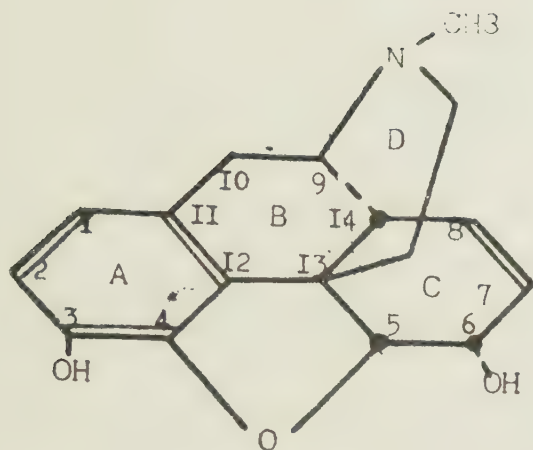
La facilité de liaison de la drogue au récepteur et la nature de la combinaison drogue-récepteur paraissent toutes deux importantes dans l'action analgésique. (5 - 62)

Les isomères inactifs bien qu'incapables d'avoir trois points de contact avec les récepteurs, peuvent réduire l'activité des isomères actifs quand on les additionne par un effet de blocage partiel. Par exemple le tartrate de dextrorphan et la d-méthadone (isomère inactif) peuvent réduire les effets analgésiques ou dépressifs de leurs énantiomorphes récepteurs actifs. (37-41).

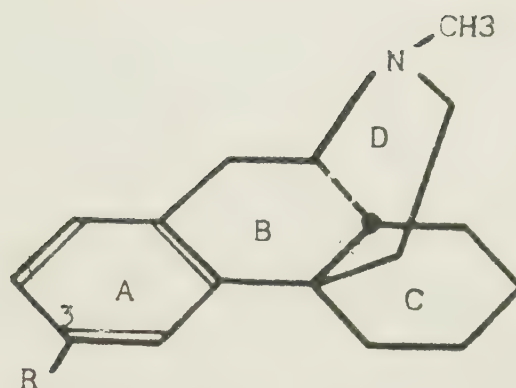
La nature de la conformation des noyaux simples de ces substances est donc importante.

BOSE (8) soutient que dans la morphine, les noyaux alicycliques A-B-C et le noyau pipéridine D sont de la forme chaise. Quoique d'accord avec ces conclusions générales, les auteurs actuels considèrent que la morphine est en forme bateau et non chaise.

Cette contrainte stérique n'existe pas dans les morphinans et BOSE conclut que les noyaux B - C - D sont de la forme chaise.



MORPHINE VIII



N - Méthyl - Morphinan (R=H)

Racémorphan (DROMORAN)(R=OH)

Une représentation schématique de l'arrangement tridimensionnel de ces structures était montrée. Du fait que la relation entre la configuration de la morphine, des morphinans et des amino-acide n'a pas été établie, on conclut donc que la structure représentant la surface de la drogue peut s'adapter à une surface réceptrice complémentaire.

De même il doit exister entre la structure plane et le groupement basique de la molécule, une certaine liaison. C'est pourquoi il est obligatoire que la surface réceptrice par laquelle l'action analgésique interviendrait comprenne ces trois points essentiels :

- 1) Un centre basique ionisé comme cation à pH physiologique afin qu'il soit capable de s'associer à un lieu anionique dans la surface réceptrice.
- 2) Une structure plane aromatique dans la molécule, afin de permettre aux forces de VAN-DER-WALLS collectives, d'établir la liaison avec une portion plane du récepteur, renforçant la liaison ionique. Celle-ci d'ailleurs, ne serait pas suffisamment constante à cause de l'échange d'ions dans les conditions biologiques.
- 3) Une partie hydrocarbonée se projetant dans une position convenable pour former avec le centre basique et la structure plane aromatique, un schéma géométrique à trois dimensions.

Beaucoup d'auteurs ont repris la question; ainsi H. HARTLEY dénie l'existence d'une corrélation entre la structure chimique et l'action physiologique, car le test de la 6-méthyl méthadone est un cas excellent mais insuffisant.

Pour G.E. FOSTER le cas de la nalorphine en tant qu'antagoniste de la morphine reste à éclaircir.

Selon G. GROWNLEE : il existe plusieurs lieux de récepteur entre morphine et antagonistes (nalorphine).

CHAPITRE V

 CARACTERISATION ET DOSAGE
 DES ALCALOÏDES DERIVES DU MORPHINAN

L'étude du métabolisme, de la répartition, et de l'élimination des alcaloïdes introduits dans l'organisme, suppose la mise au point préalable de méthodes d'analyses spécifiques.

Le grand intérêt pharmacologique des dérivés des morphinans, a conduit à de nombreux travaux orientés dans le sens de :

I - La séparation, identification

A - chromatographique

B - Electrophorèse à haute tension

C - Réaction d'identification

II - Du dosage

A - Dans les organes et liquides biologiques

B - Par formation de complexes colorés

I - SEPARATION - IDENTIFICATIONA - METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

La technique employée jusqu'ici repose sur la détermination colorimétrique de BRODIE, UDENFRIEND et DILL (4) (détermination d'amines basiques, ou la mesure du trouble obtenu avec le Réactif : Eau de brome - Bromure de potassium), pour déceler des petites quantités de Dromoran. Réaction très sensible, mais elle ne permet pourtant aucune identification des bases des morphinans présentes, d'où l'emploi des méthodes chromatographiques sur papier atteignant mieux ce but. KAISER et JORI (47) pour la première fois ont orienté les recherches sur l'identification chromatographique sur papier du Dromoran. La substance est développée d'après les indications usuelles avec la phase organique d'un mélange n-butanol, - acide chlorhydrique [1-1] et révélée avec une solution alcoolique de ferricyanure de potassium et chlorure ferrique, tandis que se forment des taches bleues avec la combinaison de morphinan phénolique.

H. JATZKE-WITZ a trouvé une méthode de chromatographie sur papier qui permet également de déceler le Dromoran. Comme moyen de migration, cet auteur a employé la phase organique du mélange n-butanol-acide formique-eau [12-1-7] et la révélation a été obtenue par le réactif de DRAGENDORF ou l'acide sulfanil-diazoté.

A.S. CURRY et H. POWELL emploient, pour déceler toxicologiquement le Dromoran, des papiers tamponnés et comme moyen de migration la phase organique du mélange n-butanol-eau-acide citronique (50-50-1); la révélation se produit également par le Réactif de DRAGENDORF

Dans les recherches d'excrétion, venaient avant tout les 3-oxy-morphinan, puis le 3-méthoxy-morphinan.

C'est une méthode permettant l'identification de ces bases pour l'examen de pureté au cours des synthèses. On pratique la méthode descendante, on emploie du papier tamponné, méthode pour la séparation des alcaloïdes. Comme moyen on se sert du mélange d'hydrate d'amyle-di-n-butyl-éther-eau et la révélation de morphinan sur le papier s'obtient par le réactif de DRAGENDORF ou l'acide sulfanil-diazoté, ou de préférence par le réactif à l'iodure de platine décrit par MUNIER et MACHEBOEUF (52), ou encore par le réactif au bleu de Prusse employé par KAISER et JORI, pour déceler les bases phénol, qui donnent avec les différentes combinaisons de morphinan des taches colorées non éliminables.

Pour la détermination semi-quantitative, les substances de comparaison à différentes concentrations, ont été laissées concurrentes; la grandeur et l'intensité des différentes taches colorées, ont été comparées entre elles. Au cours de ces travaux, il s'est produit que l'identification par comparaison avec les substances pures est beaucoup plus adéquate que la détermination des valeurs des Rf.

Chromatographie à deux dimensions

Du fait que la chromatographie sur papier conduit quelquefois à des conclusions erronées, vu que dans les urines on peut avoir des corps comme : la Nicotine, l'Eucodal ou le Dilaudid, qui donnent des Rf. semblables à la morphine ou un autre analgésique, la méthode chromatographique à deux dimensions au moyen de différents solvants était appliquée.

B - ELECTROPHORESE A HAUTE TENSION

Pour avoir des renseignements précieux et exacts avec un temps court, les auteurs japonais (46) sont arrivés à utiliser la méthode d'électrophorèse à haute tension pour séparer des substances ninhydrine-positives dans les liquides biologiques soit avec l'amyl-acétate-acide formique, soit avec l'éthyl-acétate-acide formique, soit encore avec un tampon (liquide électrolytique). La migration s'effectue vers la cathode et la durée est de 20 minutes, pour un courant de 2,5 mA et à 120 V/cm. Par cette méthode on a séparé plusieurs substances contenues dans un liquide biologique.

Ainsi, la séparation des substances basiques au moyen de l'électrophorèse à haute tension, présente une notable amélioration sur la méthode chromatographique et elle est recommandée en particulier dans des buts ambulants et judiciaires.

C - REACTIONS D'IDENTIFICATION

- une solution aqueuse à 20 % de lévorphane donne en présence d'un mélange de molybdate de sodium et d'acide sulfurique une coloration brun-jaunâtre.

- la même solution aqueuse donne avec le formaldéhyde et l'acide sulfurique une coloration jaune-verdâtre.
- en milieu fortement acide et en présence de molybdate d'ammonium, l'addition du vanadate de sodium et d'eau de brome, donne avec le levorphan une gamme de coloration permettant une différenciation des autres analgésiques opiacés (Réaction sur urines).
- le vert de bromo-crésol donne avec le lévorphane, après extraction par un solvant approprié, une coloration permettant un dosage.
- l'eau de brome donne avec le lévorphane un précipité quantitatif.
- le réactif de MILLON donne une coloration rouge violacée.
- le réactif de MELZER donne une coloration brune.

II - DETERMINATION DES COMBINAISONS DE MORPHINANS

Dans la recherche on a inclu les dérivés du morphinan chimiquement intéressants.

Des chiens ont reçu le même jour, à intervalles de 7 heures, deux fois 10 mg/Kg de sel de morphinan sous la forme d'une solution aqueuse à 1 % par voie s.c. Les urines de 24 h. ont été obtenues quantitativement par cathéter, mesurées et immédiatement soumises à l'analyse. Le sang a été tiré de la veine saphène 1 h. après l'injection, les excréments ont été examinés chaque fois.

A - DETERMINATION DANS LES ORGANES ET LIQUIDES BIOLOGIQUES

1. Détermination dans les urines

Dans l'extraction, la partie des phénols-bases est liée au glucuron et aux autres acides, qui ne peuvent pas être mis en évidence; mais ce qui est intéressant avant tout, c'est la quantité totale des bases excrétées.

L'urine de 24 h. est acidifiée avec l'acide chlorhydrique concentré et évaporé dans le vide. On chauffe 45 minutes pour hydrolyser. L'urine acide est extraite 4 fois avec de l'éther. La solution d'urine aqueuse acide est alcalinisée par l'ammoniaque concentrée à pH 9,2. Les bases sont extraites de la solution alcaline par extraction continue. Des parties aliquotes de cette solution sont employées pour l'appréciation chromatographique sur papier.

Ainsi la méthode de chromatographie sur papier pour la détermination et la caractérisation des dérivés de morphinan y compris le Dromoran (Hydroxy-3-N-méthyl-morphinan) et le ROMILAR (Méthoxy-3-N Méthyl morphinan) était décrite. Mais la différenciation de ces composés de structures identiques a été achevée par la méthode utilisant des papiers filtres tamponnés.

La d-méthoxy-3-N-méthyl-morphinan est excrétée de la même manière, ainsi que trois autres composés inattendus dans cette forme.

D'autre part, la préparation avec un groupement hydroxy-libre en position 3 a été identifiée par la même méthode, dans l'urine.

2. Détermination dans le sang

La méthode pratiquée in-vitro pour les combinaisons de morphinan dans le sang, utilise le sang complet dans lequel on n'a pas établi si les combinaisons se trouvent dans les érythrocytes ou dans le plasma.

Le sang citraté frais est additionné d'eau distillée et d'éther. Après 30 minutes de repos à la température du laboratoire, l'éther est chassé sur un bain de vapeur, on ajoute de l'acide chlorhydrique concentré et quelques gouttes de n-octanol et le mélange est chauffé 45 minutes. Après refroidissement, la solution acide est neutralisée par de l'ammoniaque concentré pour un pH 9,2 puis épuisée dans l'appareil de KUTSCHER-STEUDEL pendant 4 h. avec de l'éther et finalement posée immédiatement sur papier chromatographique. Vraisemblablement les combinaisons sont partagées si rapidement dans le sang et transformées du point de vue chimique qu'elles ne peuvent être décelées.

3. Détermination dans les excréments

Une analyse des combinaisons de morphinan qui y sont contenues n'est pas facile et empêchée par plusieurs difficultés.

Les excréments sont soumis à l'ébullition avec de l'acide chlorhydrique à 4 % pendant 1 h. Les parties solides non solubles sont enlevées et le filtrat est alcalinisé par l'ammoniaque concentré à pH 9,2. On extrait le chloroforme. Cet extrait chloroformique contenant encore trop de matières étrangères doit être traité avec de l'acide chlorhydrique 2 N. Une fois l'extrait acide purifié, les bases sont de nouveau mises en liberté et isolées par l'éther par extraction.

L'extrait ainsi obtenu est chromatographié. Dans ces excréments, on trouve toujours moins que 0,5 % des combinaisons de morphinan.

B - DETERMINATION QUANTITATIVE DU DROMORAN

Du moment où la chromatographie sur papier a pris de l'extension, pour caractériser les morphinans, plusieurs auteurs ont essayé de mettre en évidence ces produits par formation des complexes colorés avec différents indicateurs, dans des conditions bien précises afin de déceler des quantités très infimes dans les milieux biologiques.

La réaction au bromure est très sensible pour de très petites quantités, dans l'urine. Après agitation et précipitation avec le molybdate d'ammonium, on ajoute à tour de rôle le vanadate, puis vanadate et brome, ensuite le brome seul. Ainsi, on peut distinguer les différents groupes d'opiacés. C'est une réaction particulièrement sensible en milieu fortement acide qui permet un dosage (88).

Une autre réaction s'effectue avec le vert de bromo-crésol. Après agitation et décomposition du complexe formé, l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration du produit à doser.

Mais cette intensité est fonction de plusieurs facteurs :

- du milieu organique
- du pH
- de la concentration du tampon et de l'indicateur
- du choix de l'indicateur
- de la concentration de l'urine par les produits qu'elle peut contenir (urée - α Na)
- des constituants de l'urine ayant une réaction positive.

On peut, d'autre part, employer à la place du vert de bromo-crésol le méthyl-orange (4) ou le bleu de bromothymol. Avec ce dernier indicateur, on peut avoir une proportionnalité assez satisfaisante entre la concentration et l'intensité.

Certains auteurs ont essayé de voir le coefficient de solubilité du complexe formé dans les différents solvants organiques : benzol, chloroforme, éther, éthyl-acétate, tétrachlorure de carbone, monochlorobenzol et le chlorure de méthylène (dichlor-éthane). Ils ont conclu que le chlorure de méthylène était satisfaisant et donnait des résultats corrects. Cette méthode était pratiquée pour la recherche et le dosage en série.

Ainsi ces auteurs ont pu rechercher et doser des quantités ne dépassant pas un microgramme par ml.

CHAPITRE VI

METABOLISME

ABSORPTION - ELIMINATION

Le Dromoran (1-hydroxy-3-N-méthyl-morphinan) a été trouvé actif comme facteur analgésique (23-93). Etant donné la ressemblance étroite de structure avec la morphine, il a semblé qu'une analyse comparative de l'élimination du lévorphane par des chiens normaux et accoutumés présenterait de l'intérêt.

En outre, puisque le lévorphane a des isomères optiques à propriétés pharmacologiques différentes (27), les auteurs ont comparé l'élimination de ces isomères et des mélanges racémiques. Les autres aspects de cette étude comprennent l'analyse des taux dans le plasma sanguin, le taux d'absorption après administration orale et l'hydrolyse enzymatique du produit conjugué.

DETERMINATION COLORIMETRIQUE DU LEVORPHAN

La méthode colorimétrique employée est une modification de la méthode au méthyl-orange pour les amines basiques développées par BRODIE, UDENFRIEND et DILL (4). Cependant par la méthode de Brodie il était impossible d'enlever le blanc des échantillons d'urine témoin, et la technique était modifiée.

Des parties aliquotes sont prélevées sur un recueil d'urine non contaminée de 24 h. pour doser le lévorphane conjugué et libre.

A - Pour le lévorphane non conjugué, une partie aliquote est saturée par le bicarbonate de sodium, puis extraite après agitation mécanique par 60 ml. de chloroforme. La couche chloroformique est retirée et l'opération est répétée deux fois. On évapore 10 ml jusqu'à dessiccation au B.M. avec 1 ml. d'acide chlorhydrique concentré. Après refroidissement, le chloroforme sera ajouté et le total est transvasé dans un tube à essai. Cinq dixièmes de ml de réactif au méthyl-orange sont ajoutés, on agite puis on centrifuge. La couche chloroformique est soustraite et additionnée d'acide sulfurique et d'alcool. On mesure la densité optique de la solution au spectrophotomètre BECKMANN à la longueur d'onde 525 mμ.

B - Pour le lévorphane total, une partie aliquote est additionnée d'acide chlorhydrique concentré et mise à l'autoclave 30 minutes. Après refroidissement, la méthode précédente est suivie pour le dosage.

Le lévorphane conjugué est calculé en soustrayant le lévorphane non conjugué du total trouvé.

Tableau I : Valeurs trouvées pour des quantités de d - l bromhydrate de lévorphane dans les urines.

Quantités ajoutées à 10 ml d'urine (microg)	Moyenne des quantités retrouvées (microg)	Valeurs retrouvées et limitées à 99 %
25	23,7	23,7 $\pm$ 2,66
50	48,2	48,2 $\pm$ 1,99
100	99,1	99,1 $\pm$ 3,78

Le Tableau I montre les quantités retrouvées des doses de d et l bromhydrate de lévorphane ajouté à l'urine de chien, dosés par la technique citée plus haut. Les quantités de lévorphane employées pour tester l'efficacité de la technique de dosage étaient toutes comprises dans les valeurs éliminées dans les milieux biologiques après injection. Les limites étaient calculées selon SNEDECOR (72).

ELIMINATION URINAIRE PAR DES CHIENS NORMAUX ET ACCOUTUMES

Tous les chiens étaient soumis à un régime. Celui-ci était administré pendant 3 jours avant de commencer la récolte d'urine, et continué aussi longtemps que l'on recueillait de l'urine.

Les chiens accoutumés refusaient d'eux-mêmes de manger et étaient nourris tous les jours par tubage gastrique. Après que le régime ait été stabilisé pendant une période de 3 jours, le chien était sondé, l'urine recueillie mise de côté, puis on injectait au chien du bromhydrate de lévorphane par voie I.V.

L'animal était alors placé dans une cage séparée pendant 45 minutes, temps pendant lequel se produisaient vomissement et excrétion.

Le chien ensuite était placé dans une cage à métabolisme et l'urine recueillie avec sondage après 24 h. assurant la récupération, ce qu'il approche les valeurs témoins. L'analyse des échantillons d'urine était menée comme précédemment.

Tableau II : Résumé l'élimination urinaire des chiens normaux. De larges variations dans le pourcentage de l'élimination ont été trouvées être compatibles avec les précédents rapports sur la morphine.

N° du chien	Dose mg/Kg I.M.	Nombre de jours d'injection	Nombre de jours écoulés après la dernière injection	Lévorphan Total injecté en mg	Pourcentage total trouvé	Pourcentage conjugué trouvé	Pourcentage non conjugué trouvé
1	5	1	4	45	15,3 %	10 %	5,3 %
2	10	2	7	180	28,1	26,7	1,4
3	10	3	7	375	29,4	28,8	0,6
4	10	3	6	405	47,8	32,1	15,7
5	10	3	7	240	63,3	46,7	16,9
6	10	3	7	330	57,7	43	14,7
7	5	2	3	130	62,1	54,7	7,4

Tableau III : Spectre d'élimination urinaire journalière caractéristique d'un chien normal. Quantité injectée : 328 mg.

Jours d'injection	ml d'urine	mg de lévorphan éliminé			Pourcentage éliminé de lévorphan total injecté		
		Total	Conjugué	Libre	Total	Conjugué	Libre
1	250	46,9	33,4	13,5	14,2	10,1	4,1
2	250	45,4	29,5	15,9	13,8	8,9	4,8
3	250	54,3	45,5	8,8	16,4	13,8	2,7
4	250	21,4	17,9	3,5	6,5	5,4	1,1
5	200	11,1	7,2	3,9	3,4	2,2	1,2
6	200	8	5,6	2,4	2,4	1,7	0,7
7	200	3,4	2,6	0	1	0,8	0,2
Total		190,5	141,7	48,0	57,7	42,9	14,8

Tableau III : Montre l'étude caractéristique de l'élimination journalière du chien n° 6. A partir de ce tableau on peut voir que la majeure

partie du lévorphane est éliminée pendant la période d'injection et dans les 24 h. qui suivent immédiatement la dernière injection.

Mois	jours d'étude	Injection totale pendant cette période	Pourcentage total trouvé	Pourcentage conjugué trouvé	Pourcentage non conjugué trouvé
C H I E N N ° I					
0	4	360	49,5	43,6	5,9
1	4	360	50,8	38,5	12,3
2	3	270	58,4	42,9	15,5
3	3	270	61,8	45,9	15,9
4	3	270	62,9	50,1	12,8
5	3	270	66,6	58,1	8,5
C H I E N N ° I I					
0	4	420	55,5	46,4	9,1
1	4	420	48	38,2	9,8
2	3	315	49,2	37,6	11,6
3	3	315	58,4	44,4	14
4	3	315	46,2	35,5	10,7
5	3	315	56	47,4	8,6

Tableau IV : Résumé de l'élimination du d - l - Lévorphane mois par mois.

Ce tableau établit les taux d'élimination mois par mois de deux chiens ayant reçu tous les jours pendant une période de 6 mois une injection de 10 mg/Kg de lévorphane. Il est évident d'après ces données que du fait que les animaux deviennent tolérants, il n'y ait aucune diminution, soit du lévorphane total, soit du lévorphane conjugué.

OBSERVATIONS SUR LE COMPORTEMENT DES ANIMAUX

Les animaux expérimentés répondent à l'administration du lévorphane selon un schéma semblable à la morphine (56) : vomissements, excrétion, incoordination motrice, respiration affaiblie et lente, étaient manifestés

pour tous les chiens. La respiration et le contrôle moteur revenaient à la normale en 6 à 8 heures.

Chez les deux chiens utilisés pour le test d'accoutumance, vomissements et excrétion disparaissaient après 2 semaines d'administration continue et au bout d'un mois la dépression respiratoire disparaissait. L'effet narcotique était remplacé par de longues périodes d'inactivité et de repos, mais la capacité de répondre à des stimulants vocaux persistait.

Une diminution de l'appétit était évidente et il arrivait une perte de poids. Le réflexe conditionné sous forme de salivation, excrétion, au moment de l'injection était développé chez les deux chiens après environ un mois. Un chien continua ce réflexe jusqu'au moment où il fut sacrifié après six mois, mais l'autre le perdit après 3 mois d'injection quotidienne.

Autant qu'on puisse juger, il n'y eut jamais aucun besoin d'injection de la part d'aucun chien, et on rencontrait chaque jour une résistance à l'injection. En complément aux études d'élimination, sur les deux chiens accoutumés, ils furent sacrifiés tous les deux et leurs cerveaux furent fixés et colorés pour un examen histologique : aucun effet pathologique attribuable à l'administration du lévorphane.

L'administration de l'isomère lévogyre produisait vomissements, excrétion et dépression chez les chiens, tandis que l'isomère dextrogyre ne produisait aucun symptôme observable.

ELIMINATION DES ISOMERES OPTIQUES

5 mg de bromhydrate de racémorphane et des équivalents moléculaires de tartrate de lévorphane et dextrophane ont été employés, dans des buts comparatifs. Les chiens étaient nourris et subissaient des injections et l'urine était recueillie comme décrit précédemment.

TABLEAU VI - Résumé de l'étude des isomères

FORMES	Jours d'injection	Elimination totale en mg	Pourcentage total trouvé	Pourcentage conjugué	Pourcentage non conjugué
Racémique bromhydrate	2	80,8	62,1	54,6	7,5
Lévogyre tartrate	2	64,8	49,8	42,9	6,9
Dextrogyre tartrate	2	69	53,1	38,5	14,6
Racémique tartrate	2	64	49,2	38	11,2

Les calculs de pourcentage dans le tableau VI sont basés sur le bromhydrate racémique. Il est à remarquer dans ce tableau que le chien métabolise ces deux formes de manière identique, aussi bien qu'on peut les déterminer dans l'élimination urinaire.

ANALYSE DU LEVORPHAN DANS LE PLASMA

Pour contrôler la sensibilité d'application de la méthode de BRODIE, il suffit d'ajouter du lévorphane.

TABLEAU VII - Valeurs retrouvées des quantités connues de racémorphane

Quantité ajoutée à 1 ml de plasma (microg.)	Quantité retrouvée plus le blanc (microg.)	Quantité retrouvée moins le blanc (microg.)
4	5,7	4,7
4	7,2	4

Les données ci-dessus sont les moyennes de deux déterminations séparées des doses de 25 microg. de lévorphane par ml. de plasma, pouvant être retrouvés avec $\pm$ 5 % de la quantité ajoutée.

Pour doser la disparition du lévorphane du plasma, des échantillons de 10 ml de sang étaient prélevés, après centrifugation, 2 mg de plasma étaient extraits avec deux fois 5 ml. de chloroforme et additionnés de 0,5 ml. de réactif au méthyl-orange. Le reste de l'analyse était conduit comme précédemment.

Le tableau VIII montre les résultats caractéristiques d'un des trois chiens après injection lente I.V. dans la veine Saphène (4-5 minutes) de 5 mg/Kg de racémorphane. Il est probable et les résultats le confirment, que seule une quantité relativement faible injectée, peut être retrouvée dans le plasma pendant la période qui suit l'injection.

Il n'était pas prouvé si la drogue pénétrait dans les globules rouges ou si elle quittait le sang.

TABLEAU VIII - Valeurs retrouvées de racémorphane dans le plasma

Temps après échantillons	Quantité de plasma analysé	Quantité trouvée (microg./ml)
	ml	
1 échantillon après injection (moins de 60 sec. après la fin de l'injection)	2	4,7
2 minutes après injection	2	3,7
5 " " "	2	3,5
10 " " "	2	3,7
30 " " "	2	3,7
Blanc	2	2,2

DETERMINATION DU TAUX DE DISPARITION PAR LA REGION GASTRO-INTESTINALE

Des rats albènes approximativement du même poids étaient mis à jeun pendant 48 h. A chacun on donnait une quantité connue de racémorphan par voie buccale, puis après un temps mesuré on les sacrifiait. Le protocole de dosage est le même que pour les urines

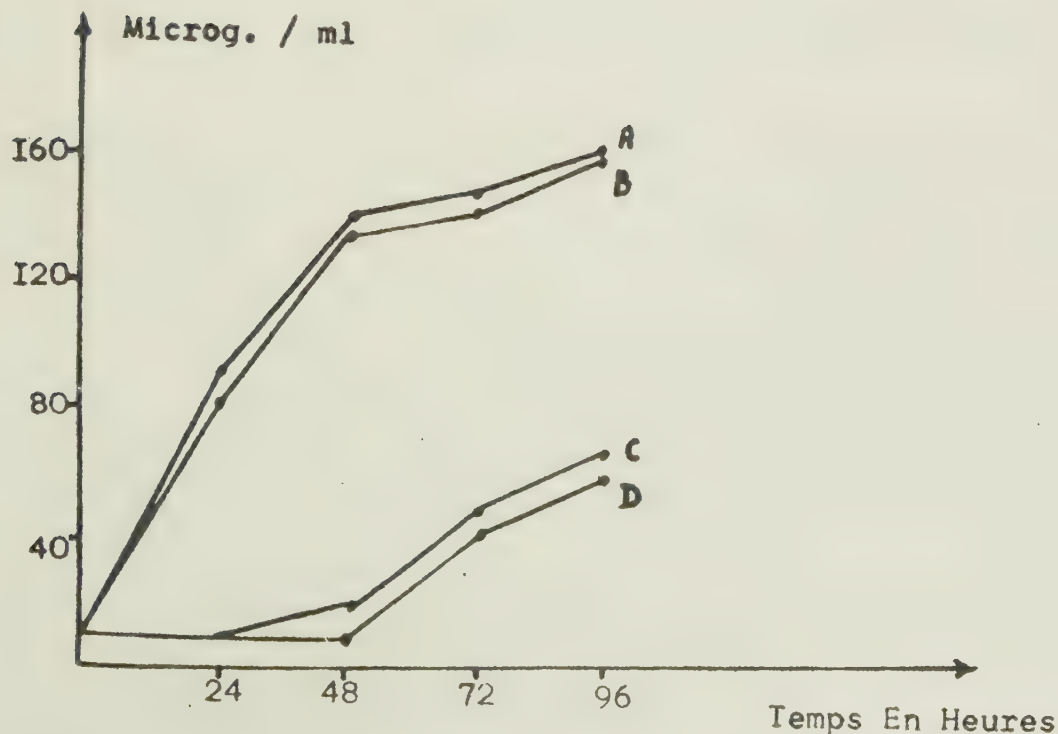
Les expériences montrent que le racémorphan administré était absorbé par environ 75 % en deux heures.

ANALYSE DU PRODUIT LIBERE PAR INCUBATION AVEC LA B GLUCURONIDASE

Il était démontré que le lévorphan aussi bien que la morphine étaient éliminés sous forme libre et sous forme conjuguée. Les travaux d'OBERST (55) montrent que la morphine est probablement combinée à l'acide glycuronique.

Pour mieux voir si le lévorphan est lui aussi éliminé sous forme conjuguée à l'acide glycuronique, Oberst a employé la méthode suivante : l'urine recueillie était amenée à pH 6 par l'acide citrique 1 M. 1 ml d'urine est additionnée de 2 ml de solution tampon (acide citrique 1 M, phosphate disodique 2 M.), puis on fera des témoins . Une solution à 5 % de B glucuronidase est ajoutée. On laisse incuber à 38°.

Débutant au temps zéro et par intervalles de 24 h., 2 tubes témoins et 2 tubes contenant le mélange enzyme-urine étaient prélevés pour l'analyse. On sature avec le bicarbonate de sodium, on inactive l'enzyme à 80° deux minutes, puis on extrait par le chloroforme, on évapore à sec après addition chlorhydrique concentré et on suit la technique précédente.



Ce graphique nous montre la différence dans les taux avec les mêmes résultats généraux obtenus dans toutes les incubations d'enzyme témoin. Il est à noter que les pentes des courbes A, B, C, D de la période 72 h. à 96 h. sont à peu près les mêmes. Ceci indiquerait que peut-être l'urine témoin et l'urine à tester hydrolyseraient toutes les deux spontanément une forme conjuguée autre que le glycuronate pour à peu près le même taux.

Cette observation est en accord avec l'hypothèse de GROSS et THOMPSON (35) pour la morphine.

TABLEAU IX - Composant de l'élimination urinaire du lévorphan

N°	Quantité enmg/100 ml trouvées par hydro- lyse acide	Pourcentage dilué	Pourcentage Hydrolyse par enzyme	Pourcentage sous quelques autres formes
1	25,3	8,7	41,7	50,6
2	18,0	18,0	71,0	11
3	10,7	6,5	58,2	35,3
4	22,6	3,4	70,0	26,6
5	15,6	12,8	59,5	27,7

Le tableau IX résume la répartition fractionnée des différentes espèces d'élimination du lévorphan. Ces données montrent que la plus grande quantité de lévorphan conjugué est éliminée en glucuronate de lévorphan, mais que les dosages quantitatifs ne sont pas entièrement justes, ce qui serait dû à une hydrolyse spontanée pour laquelle une technique de dosage n'est pas encore valable actuellement.

Quoique les ressemblances de structure du lévorphan et de la morphine soient nettement apparentes, et que l'action analgésique et les risques de l'absorption répétée soient semblables, (1), les produits d'élimination du lévorphan chez les chiens normaux et accoutumés (tableaux II et IV) indiquent des éliminations identiques.

L'élimination pendant une période par les chiens normaux s'étendait de 15,3 % par dose de 5 mg/Kg jusqu'à 63 % pour une dose de 10 mg/Kg.

Les quatre chiens accoutumés qui recevaient 10 mg/Kg pendant 3 jours avaient une élimination urinaire moyenne totale qui serait entre 28,9 % et 46 %. Le plus fort pourcentage de forme conjuguée éliminée par des chiens normaux se trouvait être la moyenne d'élimination de la forme conjuguée chez les chiens accoutumés.

Ces données indiquent que les animaux normaux et accoutumés métabolisent le lévorphan à la même échelle, autant qu'on puisse le déterminer par l'élimination urinaire. Ainsi le lévorphan diffère de la morphine dans le fait que les chiens accoutumés éliminent moins de morphine conjuguée que ne le font les chiens normaux, tandis que l'élimination de la morphine non conjuguée reste à peu près la même. ZAUDER (94) trouva à peu près les mêmes pourcentages

d'élimination pour des rats accoutumés et normaux comme le firent GROSS et THOMSON pour les chiens.

Dans le cas du lévorphane, on ne peut faire aucune hypothèse sur la relation d'accoutumance et métabolisme. Ceci est soutenu encore par le fait que des accoutumances à des fonctions physiologiques variées n'apparaissent pas au même moment. Un exemple de ceci était remarqué chez les chiens accoutumés au lévorphane, puisque vomissements et excrétion disparaissent en plusieurs jours, mais la dépression respiratoire durait plusieurs semaines.

Il était établi encore que les isomères dextro-rhane ne possèdent aucune activité analgésique ou sédatrice (45). Cependant, le chien métabolisait l'isomère dextrogyre de la même façon que l'isomère lévogyre quand on les dose dans l'élimination urinaire.

Les résultats du tableau VI peuvent être rapprochés de ceux rapportés récemment par WAY et SUNG (90) qui ne pouvaient faire aucune différence dans l'élimination des isomères d et l de la méthadone. Il semblerait que les enzymes impliqués dans les combinaisons du lévorphane ne peuvent faire aucune distinction entre les isomères d et l.

Les données du tableau VIII indiquent que seules des petites quantités de lévorphane peuvent être retrouvées dans le plasma, même 1 minute après l'injection I.V. Cependant ce temps de 1 minute est relatif, étant donné que la dose totale était administrée pendant environ 5 minutes.

Le taux d'absorption du lévorphane par la région gastro-intestinale de rat à jeun était très rapide quand la concentration était élevée. Mais quand celle-ci baissait, ce taux diminuait. L'absorption était environ de 75 % de la dose après 2 heures.

De ces travaux, nous pouvons retirer les quelques conclusions suivantes :

- 1) une modification de la technique au méthyl-orange pour les amines basiques, a été effectuée pour la détermination du lévorphane dans le plasma, l'urine, et les contenus de la région gastro-intestinale.
- 2) Les données d'élimination urinaire indiquent une étroite ressemblance entre les chiens accoutumés et normaux.
- 3) Les éliminations d'isomère d et l et d'un mélange de ceux-ci ont été trouvées identiques à l'élimination du bromhydrate racémorphane.
- 4) Le lévorphane après injection intraveineuse disparaît rapidement du plasma.
- 5) Le lévorphane par voie buccale est absorbé rapidement quand on l'administre à des rats à jeun.
- 6) Le lévorphane est partiellement éliminé en glucuronate, et il est possible qu'il le soit sous quelque autre forme conjuguée.

CHAPITRE VII

INDICATIONS THERAPEUTIQUES

Les propriétés particulières du lévorphane, telles que l'intensité et la durée de son effet, son index thérapeutique élevé, et son influence minime sur le centre respiratoire, ont incité plusieurs auteurs à substituer ce produit à la morphine dans plusieurs domaines cliniques.

En gynécologie obstétrique comme analgésique, le lévorphane est préférable à la morphine d'autant qu'il ne provoque pas d'euphomanie (73).

En pré-anesthésie, les résultats obtenus ont été très satisfaisants. Par voie s.c. il faut l'injecter de 60 à 90 minutes avant le début de la narcose. Pour les cas urgents, il suffit de le faire dans les 15 à 20 minutes précédant l'anesthésie par une injection I.V. lente de 2 à 3 minutes (74).

Comme supplément à l'anesthésie générale lors des opérations, le lévorphane semble offrir les meilleurs avantages avec un minimum d'effets secondaires (13).

En médecine interne, le lévorphane présente des avantages sur la morphine par son effet analgésique remarquablement constant et son effet hypnotique un peu moindre, sa durée d'action beaucoup plus longue (50).

En chirurgie, contre les douleurs post-opératoires et d'autres douleurs, le lévorphane ne révélait pas des effets secondaires (75).

L'effet analgésique en oto-rhino-laryngologie était satisfaisant et la lucidité pendant l'opération dans la grande majorité des cas était totale. La tolérance au lévorphane a été toujours bonne quelle que soit la dose (76).

En chirurgie thoracique, l'action analgésique est meilleure et prolongée par rapport à la péthidine et à la di hydromorphinone, car ni des phénomènes d'abstinence, ni manifestations d'euphomanie ne furent observés (14).

Dans la lutte contre les douleurs des cancéreux, les phénomènes d'abstinence et de toxicomanie sont improbables (43).

Dans la chirurgie abdominale pas d'atonie quand l'administration est faite par voie entérale et générale (53).

L'association avec l'atropine ou la scopolamine donne un effet analgésique puissant (6), de même l'association avec les barbituriques pour apaiser la douleur, car le lévorphane n'est pas hypnotique ou très faible (36).

A faible dose, l'association du lévorphane avec la péthidine (DOLOSAL) comme analgésique, crée une vaso-dilatation et de ce fait l'analgésie est plus forte (44).

Enfin, le lévorphane est un puissant analgésique, un adjuvant satisfaisant pour le protoxyde d'azote et l'oxygène anesthésique. Il se conduit d'une façon semblable à la péthidine (7).

DEUXIEME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

Autant par son aspect pharmaco-dynamique que toxicologique, l'étude d'un médicament exige la recherche de la répartition de celui-ci ou de ses divers métabolites dans les différents secteurs de l'organisme, ainsi que l'établissement de ses formes d'élimination.

Nous avons dans les chapitres précédents donné un aperçu de la source des travaux déjà effectués pour les divers dérivés du morphinan intéressant la thérapeutique.

Nous nous sommes proposé d'étudier ce même problème, mais sous un angle plus toxicologique, étant donné le caractère de "Drogue stupéfiante" qui s'associe aux propriétés hautement analgésiques du Dromoran (lévorphan), bien que nous n'ayons pu nous procurer en France que l'isomère dextrogyre du Dromoran, non stupéfiant.

L'expertise toxicologique dans son cadre général, qu'elle se situe à l'hôpital à l'arrivée d'un malade comateux, ou à la suite d'un décès ayant provoqué l'intervention des autorités judiciaires, est rarement limitée à la recherche d'un seul toxique.

D'autre part, et surtout dans le cas d'une hospitalisation d'urgence impliquant une thérapeutique immédiate, il y a toujours intérêt à utiliser des méthodes d'analyses rapides et sûres.

C'est dans ces perspectives que nous avons confronté dans une expérimentation animale la méthode classique polyvalente de STAS-OTTO-OGIER-KOHN-ABREST (54) avec la méthode de M. et P. CHAMBON (10) plus étroitement adaptée à la recherche de la morphine et elle-même inspirée de celle de WOODS.(89)

Nous allons rapidement rappeler les modes opératoires de ces techniques analytiques, puis le protocole de l'intoxication expérimentale des chiens que nous avons pu nous procurer, et enfin, nous rendrons compte des résultats de nos investigations sur la répartition dans les viscères, sang, urine et fèces des formes de métabolisme du dextrorphan (d-Hydroxy-3 N-méthyl-morphinan)énantiomorphe du Dromoran.

La Méthode de WOODS fut mise au point pour des fins pharmacologiques. L'auteur se proposait de définir le sort métabolique de la morphine, notamment dans l'organisme des chiens recevant des quantités considérables d'alcaloïdes afin de pouvoir plus sûrement déterminer les divers métabolites. Elle visait aussi à confirmer l'existence des formes conjuguées de la morphine et à les doser, mettant aussi en parallèle la forme libre et la forme conjuguée, telle qu'elle pouvait être démasquée après hydrolyse.

Quelques modifications apportées par M. et P. CHAMBON permettent d'envisager son application dans le cas d'une expertise plus générale pouvant mettre en cause d'autres substances organiques et alcaloïdiques.

CHAPITRE I

METHODES DE DOSAGE

I - METHODE DE M. ET P. CHAMBON

Le principe de la méthode de Woods dans le cas de dosage de la morphine totale consiste essentiellement dans l'hydrolyse chlorhydrique à l'autoclave d'un extrait trichloracétique déféqué des humeurs ou tissus libérant la morphine antérieurement conjuguée.

La morphine totale extraite par solvant organique est destinée au dosage spectrophotométrique selon la méthode de BRODIE, issue de celle de PRUDHOMME (59) par formation du complexe.

Technique de séparation et dosage de la morphine applicable au dextrorphanRéactifs

- Acide trichloracétique libre et en solution à 20 %.
- Chloroforme pur, lavé et distillé extemporanément.
- 1,2 dichloréthane lavé, séché, redistillé $E = 83^{\circ}5$.
- Réactif avec chlorure de P-nitrobenzoyle 2 g dans 100 ml de dichloréthane : à préparer extemporanément.
- Tampon borate pH 9

acide borique	48 g.
OH Na	15 g.
dissous dans H ₂ O Q.S.P.	1 litre
- Tampon phosphate pH 5

phosphate disodique	3,5 g.
" monopotassique	132,7 g
eau distillée Q.S.P.	1 litre
- Solution d'acide borique

acide borique	0,5 M
acide borique	3,09 g
eau distillée	100 ml
- Réactif au méthyl-orange

Dissoudre à chaud 500 mg de méthyl-orange dans 100 ml d'eau et filtrer à chaud. Agiter trois fois la solution avec V.E. de chloroforme pur et lavé. Avant usage, diluer 0,5 ml de cette solution stock avec V.E. de solution d'acide borique 0,5 M.

TechniqueA - Déprotéination extractive

Prise d'essai : Au cours d'une expertise ne comportant pas d'orientation très précise, il apparaît nécessaire malgré la très grande sensibilité de la méthode, d'opérer avec des prélèvements relativement importants qui pourront être de l'ordre de 20 ml d'urine, 2-3 ml de bile, 10 g. de tissus rénal ou hépatique.

Les tissus broyés avec éventuellement des appareils spéciaux ou plus simplement au mortier avec du sable lavé et incinéré et en présence d'acide chlorhydrique 0,5 N, 9 vol. sont amenés à l'état de bouillie homogène dont par centrifugation on sépare la phase aqueuse.

Cette solution aqueuse extractive est additionnée du 1/10^e de son poids d'acide trichloracétique que l'on fait dissoudre, homogénéisée elle est soumise à centrifugation. On obtient la solution acide alcaloïdique privée des protéines.

La bile est déprotéinisée par addition de 5 vol. de solution d'acide trichloracétique à 10 % et centrifugée.

L'urine est de la même façon additionnée du 1/10^e de son poids d'acide trichloracétique, homogénéisé et centrifugée.

B - Séparation des bases non morphinoïdes

L'éventualité de l'administration thérapeutique des médicaments aussi basaux que la codéine, ou autres sédatifs de la toux de la série du morphinan, et à fonction phénolique bloquée, invite à les séparer préalablement autant pour leur identification que pour éviter des interprétations ultérieurement plus difficiles. L'expérimentation prolongée en milieu ammoniacal (M. et P. CHAMBON) démontre le rôle déterminant joué dans la production artificielle de l'oxydimorphine par l'alcalinité sodique ou potassique. Cette méthode permet de séparer, sans inconvénients, la morphine, la codéine ou l'Eukodal des autres alcaloïdes non phénoliques.

Les précédentes solutions trichloracétiques déprotéinisées sont nettement alcalinisées par l'ammoniaque au rose soutenu de la phénolphthaléine; la solution est épuisée à 2 reprises avec le chloroforme purifié; puis avec du benzène fraîchement distillé. Ces solvants réunis pourront ensuite servir à la recherche d'autres alcaloïdes.

C - Hydrolyse chlorhydrique de la morphine "liée"

La solution aqueuse précédemment épuisée est neutralisée par l'acide chlorhydrique, et additionnée du 1/10^e de son volume d'acide chlorhydrique concentré, et chauffée à l'autoclave à 120° pendant 30 minutes.

La solution hydrolysée, additionnée de 3 % d'acide trichloracétique est centrifugée. Le culot est lavé avec quelques ml de solution d'acide trichloracétique à 10 %. Les liquides centrifugés réunis, sont soumis à un nouvel épuisement, de façon à éliminer les produits d'hydrolyse non basiques, acides ou phénoliques que l'expertise peut avoir à considérer.

D - Séparation de la morphine

La morphine totale ainsi libérée est extraite de sa solution, non point par l'acétate d'éthyle recommandé par Woods qui exige des quantités considérables de solvants, mais en s'inspirant du travail de Guyot, c'est-à-dire après alcalinisation par le bicarbonate de sodium en excès, par le chloroforme en milieu alcoolique à 30°.

La solution morphinique est donc additionnée d'alcool à 95° dans la proportion de 33 vol. pour 73 vol. de solution d'hydrolyse, et par addition très progressive de bicarbonate de sodium pulvérisé, d'abord neutralisée puis additionnée d'un léger excès. Cette solution est épuisée avec soins par 3 fois 20 ml de chloroforme purifié.

Les extraits chloroformiques réunis et centrifugés ou éventuellement filtrés sont soumis à concentration, par distillation sous pression réduite, à 5 ml. environ.

Cet extrait chloroformique est épuisé à deux reprises par agitation avec chaque fois 5 ml d'acide chlorhydrique N/2. Ces solutions chlorhydriques réunies centrifugées sont débarrassées de la couche organique.

Une partie aliquote de cette solution aqueuse chlorhydrique de l'ordre de 1 à 2 ml sera réservée aux essais de chromatographie sur papier phosphaté selon Munier par le butanol-eau à saturation.

E - Estérification et complexation selon Woods

Verser dans une petite ampoule à décantation 5 ml de la solution chlorhydrique précédente, ajouter 1 ml de solution de sulfite de sodium à 40 %, neutraliser avec 2 à 3 gouttes de solution de Na OH à 43 %.

Agiter 40 minutes à la machine à agiter. Passer le mélange dans une ampoule à décantation, ou centrifuger et rejeter la couche aqueuse superficielle. Laver la phase organique par agitation avec 5 ml de tampon borate pH 9 pendant 1 minute et éliminer la phase aqueuse.

Laver encore la phase organique par agitation 1 minute avec 5 ml de tampon phosphate pH 5 et séparer toujours quantitativement la phase organique, contenant l'ester P - nitrobenzoïque de la morphine.

La phase organique placée dans une petite ampoule à décanter est additionnée de 0,5 ml de solution réactif de méthyl-orange et agitée énergiquement pendant 10 minutes.

Séparer parfaitement la phase organique, qui a pu s'il y avait de la morphine estérifiée, se teinter en orangée, dans un tube à centrifuger, et après centrifugation, éliminer avec soin par aspiration toute trace de la solution aqueuse de méthyl-orange. Filtrer encore la solution organique du complexe sur un fragment de coton hydrophile desséché, destiné à éliminer complètement toute la solution aqueuse.

La solution du complexe P-nitro-benzoyl-morphine-méthyl-orange dans le dichloréthane pourra être utilement examinée au spectrophotomètre, et s'il est nécessaire, par dilution dans le dichloréthane. Une partie aliquote sera mise en réserve pour une chromatographie éventuelle.

La fraction restante (5 ml) de la solution organique du complexe est versée dans une petite ampoule à décanter et agitée énergiquement pendant 5 minutes avec 4 ml d'acide chlorhydrique N/1. La solution aqueuse se colore en rouge violacé plus ou moins intense, correspondant à la dissociation du complexe et à la libération du méthyl-orange. La phase organique retient la majeure partie de l'ester morphinique.

Séparer quantitativement la solution aqueuse colorée de méthyl-orange. Lire la densité optique à 515 m, à la rigueur avec un photomètre muni d'un écran convenable et à une dilution appropriée à la mesure précise. De la densité optique, on déduit sur la courbe d'étalonnage la concentration.

F - Etalonnage de la courbe de spectrophotométrie

La multiplicité des opérations décrites entraîne d'inévitables pertes. Il en résulte que pour obtenir un dosage correct, une courbe étalon des rapports, densités optiques des solutions résiduelles de méthyl-orange/concentration morphine doit être établie par points successifs. Les prises d'essais correspondantes échelonnées entre 3 et 20 microg. subissent toutes les opérations d'extraction, estérification, complexation. Il va sans dire qu'un témoin est effectué sans morphine et mesure la qualité des réactifs et des manipulations.

Nous avons appliqué cette technique dans son ensemble; elle nous a permis de retrouver l'Hydroxy-3 N-méthyl-morphinan. Comme pour la morphine, l'Hydroxy-3 N-méthyl-morphinan libre peut être recherché selon le même protocole, en éliminant l'étape hydrolyse à l'autoclave. Pour cela le filtrat trichloracétique de déprotéinisation provenant des tissus ou des liquides biologiques en expertise, après addition d'un excès de bicarbonate de sodium, puis d'alcool pour réaliser un titre voisin de 30° est épuisé par le chloroforme. A cet extrait qui contient l'alcaloïde libre, on fait subir les différentes opérations prévues dans les paragraphes D et E de la technique précédente.

Nous avons obtenu une courbe d'étalonnage pour l'hydroxy-3 N-méthyl-morphinan à partir du d-Hydroxy-3 N-méthyl-morphinan (dextrorphan = isomère dextrogyre du Dromoran) cristallisé, dissous dans de l'eau distillée et acidifié par quelques gouttes d'acide chlorhydrique.

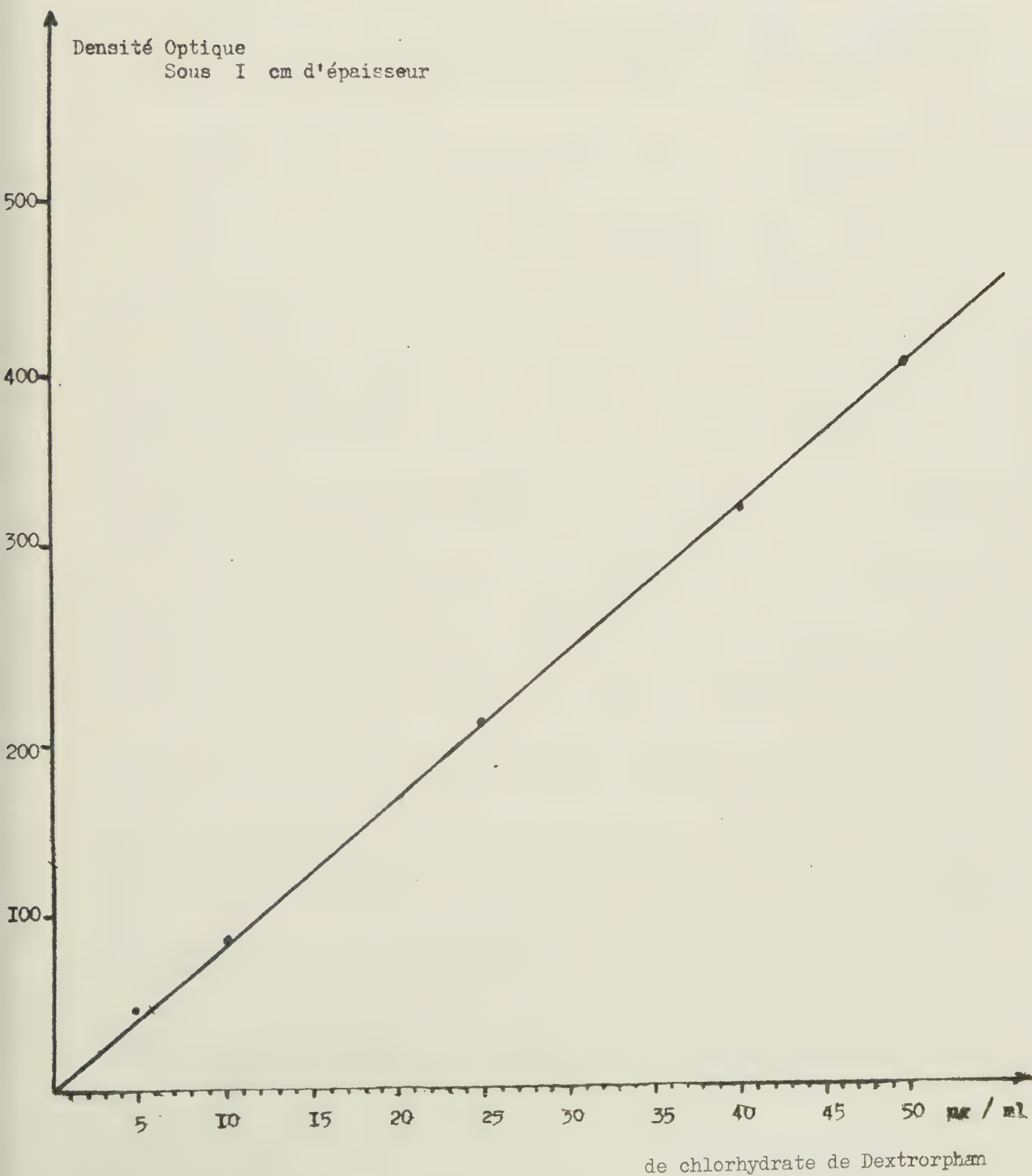
Cette solution contenant 50 microg./ml de chlorhydrate de dextrorphan conservée au réfrigérateur, nous permet de faire un témoin pour chaque dosage. Ainsi nous avons obtenu un tracé rectiligne (voir page suivante). Les résultats obtenus sont exprimés en chlorhydrate de dextrorphan, et le volume final est de 4 ml.

Densité optique en fonction de la concentration en chlorhydrate de dextrorphan

Cl. dextrorphan	Densité optique
5 microg./4 ml.	47
10 " /4 ml.	83
25 " /4 ml.	207
50 " /4 ml.	403

Densité optique mesurée au spectrophotomètre électronique de JOBIN-YVON, sous 1 cm d'épaisseur.

Courbe d'étalonnage de chlorhydrate de Dextrorphan



II - METHODE DE STAS-OTTO-OGIER ET KOHN-ABREST

Nous avons appliqué la méthode de STAS selon le protocole suivant :

Après broyage à l'aide de sable lavé et calciné, les produits biologiques subissent une macération alcoolique et tartrique, puis une série de purification successive, de précipitation par l'alcool, filtration et distillation. Nous éliminons l'alcool complètement par distillation et le produit final obtenu est épuisé à plusieurs reprises par des différents solvants, pour éliminer toute substance susceptible de contribuer à une perturbation de dosage.

Pour cela :

- en milieu acide, l'éther de pétrole élimine les graisses et les matières résineuses.
- de même en milieu acide l'éther éthylique dissout et extrait les phénols, les acides organiques et dans le cas général toute une série de matières toxiques solubles dans l'éther en milieu acide.
- en milieu alcalin le chloroforme (par addition de bicarbonate de sodium et de 30 % d'alcool à 95° jusqu'à coloration bleue de l'indicateur B.R. P. codex 37). Cette modification (extraction par le chloroforme en milieu alcalin) facilite l'extraction des alcaloïdes. L'épuisement sera renouvelé plusieurs fois et les solutions chloroformiques réunies seront évaporées à quelques ml. On épuise la solution restante par 5 ml d'acide chlorhydrique 0,5 N.

Nous allons détailler un exemple des opérations que nous avons effectuées lors des dosages pour faire mieux ressortir les affinités de cette méthode.

Partant de 45 g. de tissu rénal après broyage et addition de 70 ml d'alcool à 90°, le macérat est abandonné à la température du laboratoire.

Le filtrat est évaporé à 40° sous vide à une pression de 15 mm de Hg et le résidu est de nouveau traité avec environ 300 ml d'alcool à 90°. Après agitation et filtration, l'alcool est de nouveau évaporé. Cette purification est renouvelée plusieurs fois. Le résidu est finalement repris par 100 ml. d'alcool absolu agité, filtré, puis évaporé sous vide.

Le liquide restant dans le ballon est introduit dans une ampoule à décantier et traité par 30 ml. d'éther de pétrole. Après agitation de 10 minutes, on décante la phase aqueuse.

La phase aqueuse est traitée par 30 ml. d'éther éthylique agitée pendant 10 minutes puis décantée (éther acide). Elle est ensuite alcalinisée par le bicarbonate de sodium et de nouveau traitée par 30 ml d'éther éthylique. On décante (éther alcalin).

La phase aqueuse alcalinisée est traitée par 30 ml de chloroforme, agitée et décantée. On renouvelle 2 fois et les solutions chloroformiques réunies sont évaporées à quelques ml. pour le dosage.

Par cette méthode, nous arrivons à débarrasser la matière première de toutes les substances gênantes qu'elle peut contenir. En effet, chacune de ces phases d'extraction nous permet d'extraire une catégorie des produits.

Ainsi :

- l'alcool à 90° débarrasse la substance des matières protéiques.
- l'alcool absolu enlève les dernières traces protéiques résistantes à l'alcool à 90°.
- l'éther de pétrole dissout les matières grasses, résineuses et les colorants extractifs, quelques phénols, le camphre et des huiles essentielles.
- l'éther acide entraîne les acides organiques (oxalique, salicylique, picrique), les phénols et leurs éthers, les esters, les anhydrides d'acide, les amides et uréides, les glucosides et quelques alcaloïdes à sels dissociés : papavérine.
- l'éther alcalin entraîne lui aussi les alcaloïdes et bases synthétiques, de même que les alcaloïdes animaux connus sous le nom de ptomaïnes.
- le chloroforme récupère finalement les alcaloïdes insolubles dans l'éther, comme la strychnine et spécialement la morphine.

On effectue donc sur la solution chlorhydrique le dosage de l'alcaloïde selon le protocole décrit dans le paragraphe E de la méthode de M. et P. CHAM-BON. Ainsi nous obtenons la quantité d'alcaloïdes libres.

D'autre part nous avons essayé de voir si l'on arrive à retrouver le produit toxique dans le liquide épuisé résiduel de la méthode de STAS. La solution aqueuse alcaline restante après extraction par le chloroforme (queue de la méthode de STAS), et alcalinisation, est additionnée du 1/10e de son volume d'acide chlorhydrique concentré, puis hydrolyse à l'autoclave à 120° pendant 30 minutes. Ainsi on hydrolyse les conjugaisons, puis on extrait par le chloroforme alcoolique après neutralisation par le bicarbonate de sodium. On termine le dosage de l'alcaloïde libéré par la même technique, ce qui nous donne le toxique à l'état conjugué.

L'expérience montre que par ce processus nous arrivons à retrouver en partie les résultats donnés par la méthode de Woods modifiée.

CHAPITRE II

EXPERIMENTATION ANIMALE

CHIEN I

A - DOSAGE DE L'HYDROXY-3 N-METHYL-MORPHINAN

Nous avons au cours de cette expérimentation, visé à demeurer dans les limites toxicologiques moyennes.

L'expérience était conduite sur un chien mâle, de 2 ans environ, pesant 13,500 Kg. A 9 h.45, nous lui avons injecté par voie s.c. une solution de 30 mg de chlorhydrate de dextrorphan (soit 2,225 mg/kg).

Après l'injection, l'animal était mis dans une cage spéciale de manière à pouvoir recueillir les urines. Il est seul dans la cage, au calme, sans nourriture, mais avec de l'eau à volonté. Il ne dort pas et a son attention éveillée. A 18 h.45 (9 h. après l'injection de dextrorphan) le chien était sacrifié par saignée à la veine fémorale après anesthésie à l'éther.

Nous avons prélevé les différents humeurs et organes :

- Sang 940 g.
- Reins 66 g.
- Foie 368 g.
- Vésicule biliaire 17 g.

Nous ligaturons le canal cystique pour avoir la totalité de la bile. (14,7 g.)

- Vessie et son contenu 317 g.

Nous ligaturons l'urètre avant de la prélever, nous obtenons ainsi 248 ml d'urine.

- Estomac. La ligature du pylore et du cardia est nécessaire pour conserver le contenu.

Pour le dosage, on prélève le contenu qui est additionné des eaux de rinçage (quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré pour 100 ml d'eau distillée).

Contenu et eau de rinçage : 547 g.

- Intestin. Là aussi nous ligaturons les deux extrémités; son contenu et les eaux de lavage = 390 g.

En attendant le dosage, tous ces prélèvements étaient conservés au réfrigérateur à + 4° en flacons bien bouchés et étiquetés convenablement selon les modalités d'une expertise toxicologique.

24 à 48 h. après la mort de l'animal, nous avons commencé les dosages du dextrorphan, en premier dans la bile, les urines, l'estomac et le sang. Les autres dosages ont été pratiqués environ 45 jours après.

Etant donné la rapidité d'hydrolyse des formes conjuguées, qui peut se produire par voie enzymatique, les résultats ont pu subir quelques modifications.

Le tableau suivant rapporte l'ensemble des résultats de dosage obtenus après application de ces techniques analytiques.

Elimination du dextrophan injecté par voie s.c.

Chien I : Dose injectée : 30 mg de chlorhydrate de dextrophan
(soit 2,225 mg/Kg) - Sacrifié 9 h. après l'injection

Matériel analysés	Méthode de M. et P. CHAMBON			Méthode de STAS	Méthode de M. et P. CHAMBON après hydrolyse des liquides résidu- aires déjà épuisés selon STAS		
	D.L.	D.C.	D.T.	D.L.	D.C.	D.T.	
24 à 48 h. {	Bile..... 14,7g	299	3128	3427	360	976	1336
après la {	Urine..... 248 g	1260	1385	2645	1917	873	2780
mort {	Estomac..... 247 g	7,75	9,75	17,5	Traces	21,5	21,5
{	Sang..... 940 g	8,9	20	28,9	Traces	Traces	Traces
Echelonné {	Foie..... 368 g	33	45,5	78,5	67	40	107
sur {	Reins..... 66 g	13,8	32,8	46,5	Traces	Traces	
45 jours {	Intestins 390 g	27,5	50	77,5			

D.L. = dextrophan libre

D.C. = " conjugué

D.T. = " total

Les résultats sont exprimés en microgrammes de chlorhydrate de dextrophan.

Quelles sont les conclusions que nous pouvons tirer de ces résultats ?
Si nous comparons les deux méthodes, celle de STAS-OTTO-OGIER à celle de M. et P. CHAMBON, nous pouvons les diviser en deux parties :

D'une part selon la méthode de M. et P. CHAMBON, il est normal de trouver une quantité de toxique beaucoup plus élevée que ne le permet la méthode de STAS.

D'autre part, en comparant les résultats et spécialement l'alcaloïde dosé par la méthode classique de STAS, nous constatons que les doses trouvées seraient incomparables, surtout pour la bile, les urines et le foie. Dans les autres organes et liquides biologiques, la méthode de STAS donne des résultats nuls, celle de M. et P. CHAMBON donne des chiffres 4 fois plus élevés.

Nous pouvons déjà conclure que la méthode de M. et P. CHAMBON pour la valeur et la spécificité dans l'ordre de la différenciation des formes libres et conjuguées est nettement supérieure à celle de STAS-OTTO-OGIER. Cette dernière tout en gardant sa valeur dans la recherche toxicologique systématique demeure insuffisante.

Il est donc nécessaire dans ces recherches et dosages :

- de la compléter par l'hydrolyse acide
- d'appliquer une méthode plus complète (CHAMBON)
- d'effectuer un parallélisme entre les deux pour constituer une idée précise du toxique et son élimination qui, ne l'oublions pas, sous forme conjuguée, correspond à un mode de détoxication.

Nous constatons dans cette expérience que le produit toxique s'élimine sous ses deux formes libre et conjuguée. Cette dernière est prédominante, car elle représente la majeure partie de cette élimination.

Nous remarquons aussi que cette forme conjuguée est de beaucoup la plus importante dans la bile, ce qui nous fait penser au rôle primordial du foie dans la formation et l'élaboration de cette conjugaison. Nous constatons enfin que cette élimination se fait pour la plus grande partie dans les urines, car le produit s'y trouve sous ses deux formes. Dans les fécès, une partie s'élimine aussi. Nous avons reporté au chapitre suivant l'identification de l'alcaloïde par chromatographie.

CHIEN II

B - DOSAGE DE L'HYDROXY-3 N-METHYL-MORPHINAN

Dans cette expérience, nous avons pensé prolonger la durée du métabolisme à 17 h.

Nous avons pris un chien mâle de 10 Kg 500. A 16 h.50, nous lui avons injecté 30 mg (soit 2.857 mg/Kg) en solution de chlorhydrate de dextrorphan par voie sous-cutanée.

Nous avons placé l'animal dans sa cage, avec de l'eau à volonté. Après l'avoir anesthésié à l'éther, nous l'avons sacrifié par saignée à la carotide à 9 h.30 le lendemain matin, soit 16 h.40 après l'injection. Comme dans l'expérience précédente, le chien n'a pas uriné pendant le temps de 16 h.40. Nous avons recueilli les urines et dans les mêmes conditions que pour le chien N° I nous avons prélevé les différents humeurs et organes :

- Sang	864 g.
- Reins	49 g.
- Foie	314 g.
- Vésicule biliaire	13,5 g. de bile
- Vessie	187 g. d'urines
- Estomac	350 g. (contenu + eau de lavage)
- Intestin	290 g. (contenu + eau de lavage)

Tous ces prélèvements ont été conservés au réfrigérateur à + 4° pour éviter toute altération ou hydrolyse des formes conjuguées dans des flacons bouchés et étiquetés suivant les règles toxicologiques.

Nous avons commencé le dosage du dextrorphan dans l'urine et la bile, environ 5 h. après la mort de l'animal. Les résultats obtenus dans cette deuxième expérimentation sont résumés dans le tableau suivant et nous permettent de faire quelques commentaires.

Une chose à souligner, c'est l'espace qui sépare l'injection et la mort de l'animal. La dose injectée est la même. D'autre part, la comparaison des résultats obtenus dans les deux expériences nous montrent les quelques constatations suivantes :

Il est logique de penser que la période de 16 h.40 a permis au toxique d'achever presque en totalité son métabolisme; cela est significatif par la comparaison des deux tableaux . D'autre part, les résultats obtenus dans le foie et dans la bile sont concluants. Ils nous permettent de dire que le toxique s'est trouvé presque en totalité dans la bile sous forme conjuguée et en quantité très réduite, comparé au contenu de la vésicule à la 9ème heure.

La bile est rejetée dans le tube digestif, nous aurions dû retrouver la majeure partie de l'alcaloïde dans l'intestin. Or il n'en est rien, on n'y retrouve que 580 μ microg. Mais dans les urines nous en trouvons une grande quantité 6719 μ microg correspondant à 20,09 % de la dose totale injectée. Il est logique de penser que le produit que nous aurions dû retrouver dans l'intestin est repassé dans le sang par réabsorption intestinale, en vue de son élimination par le rein. D'où sa présence en quantité importante dans l'urine, ce qui prouve la théorie du cycle entéro-hépatique.

Chien II : Dose injectée : 30 mg de chlorhydrate de dextrorphan
(soit 2,85 mg/Kg) - Sacrifié 16 h.40 après l'injection

Matériels Analysés		Méthode de M. et P. CHAMBON Résultats exprimés en chlorhydrate de dextrorphan		
		D.L.	D.C.	D.T.
5 h. après la mort	Bile 13,5 g	Traces	187 Microg.	187 Microg.
	Urine 187 g	462 Microg.	6257 "	6719 "
Echelonné sur 45 jours	Estomac 350 g	70 "	264 "	334 "
	Sang 864 g	0 "	82 "	82 "
	Foie 314 g	54 "	120 "	174 "
	Reins 49 g	58 "	33 "	91 "
	Intestins 290 g	130 "	450 "	580 "

D.L. = dextrorphan Libre - D.C. = dextrorphan conjugué - D.T. = dextrorphan total

Nous employons ici uniquement la méthode de M. et P. CHAMBON qui nous donne des résultats supérieurs à la méthode classique de STAS. Là aussi nous constatons que le toxique est sous ses deux formes (libre et conjuguée) dans l'organisme.

C - IDENTIFICATION DU d-HYDROXY-3-N-METHYL-MORPHINAN DANS LA BILE ET LES URINES CHEZ LES CHIENS I ET II

Nous avons dosé précédemment le toxique sous sa forme libre et sous sa forme liée après hydrolyse, dans les différents prélèvements. Nous allons maintenant procéder à son identification. En effet, nous isolons d'abord l'alcaloïde et préparons ensuite la base, puis caractérisons celle-ci par chromatographie et par des réactions colorées.

a) Isolement de l'hydroxy-3-N-méthyl-morphinan

Dans la méthode de M. et P. CHAMBON, le dosage du toxique se fait sur 5 des 10 ml d'acide chlorhydrique 0,5 N ayant extrait l'alcaloïde de la prise d'essai de l'humeur ou des viscères. Le restant de cette solution pourra nous servir à son identification.

Sur les 4 ml de la solution précédente, contenant le produit à l'état de chlorhydrate sont ajouté 2 ml d'alcool à 95° et 5 ml de chloroforme. On neutralise la solution par de l'ammoniaque dilué au demi, jusqu'à l'alcalinité (virage au bleu de l'indicateur BRP), on ajoute deux gouttes d'ammoniaque au demi en excès, puis on agite énergiquement 5 minutes. On laisse décanter et on sépare la couche chloroformique. On renouvelle deux fois l'opération. On réunit les liquides chloroformiques et on évapore à 30-35° au B.M. sous vide. Ainsi la base obtenue nous permettra l'identification.

De la même manière, nous préparons les bases témoins à partir de leurs chlorhydrates (chlorhydrates de morphine et de dextrorphan purs).

Il est à noter que dans ces opérations, il est dangereux de passer en milieu trop alcalin, étant donné que ces bases sont très sensibles à l'oxydation dans ce milieu.

D'autre part nous avons préparé l'aminooxyde et l'oxydi dextrorphan pour avoir plus de sécurité.

L'aminooxyde (57) était préparé à partir de la base par action du peroxyde d'hydrogène (110 volumes), puis laissé 12 h. en contact, ensuite évaporé à sec sous pression réduite. On épuise à chaud par l'éther deux fois. Le résidu ainsi obtenu débarrassé de la base non attaquée, est repris par une très faible quantité d'eau distillée puis déposé sur des bandes à chromatographie.

L'oxydi dextrorphan est préparé aussi à partir de la base, par action de l'éther contenant du peroxyde et de la soude. On laisse 48 h. en contact, puis on évapore à sec sous pression réduite. Le résidu obtenu est repris par le chloroforme puis déposé sur une bande de papier à chromatographie.

Ces deux formes de transformation importantes de toxiques nous permettent l'identification dans le cas où les solvants organiques contiendraient des peroxydes (9) susceptibles d'altérer l'alcaloïde au moment de l'extraction, ainsi que le marque M. CHAMBON. En effet, il est nécessaire dans le choix et la préparation de ces solvants organiques de prendre toutes les précautions possibles; le chloroforme ou le dichloréthane doivent être lavés, séchés et redistillés avant leur emploi. En toxicologie, nous utilisons par exemple l'éther desséché et déperoxydé sur sodium.

b) Chromatographie

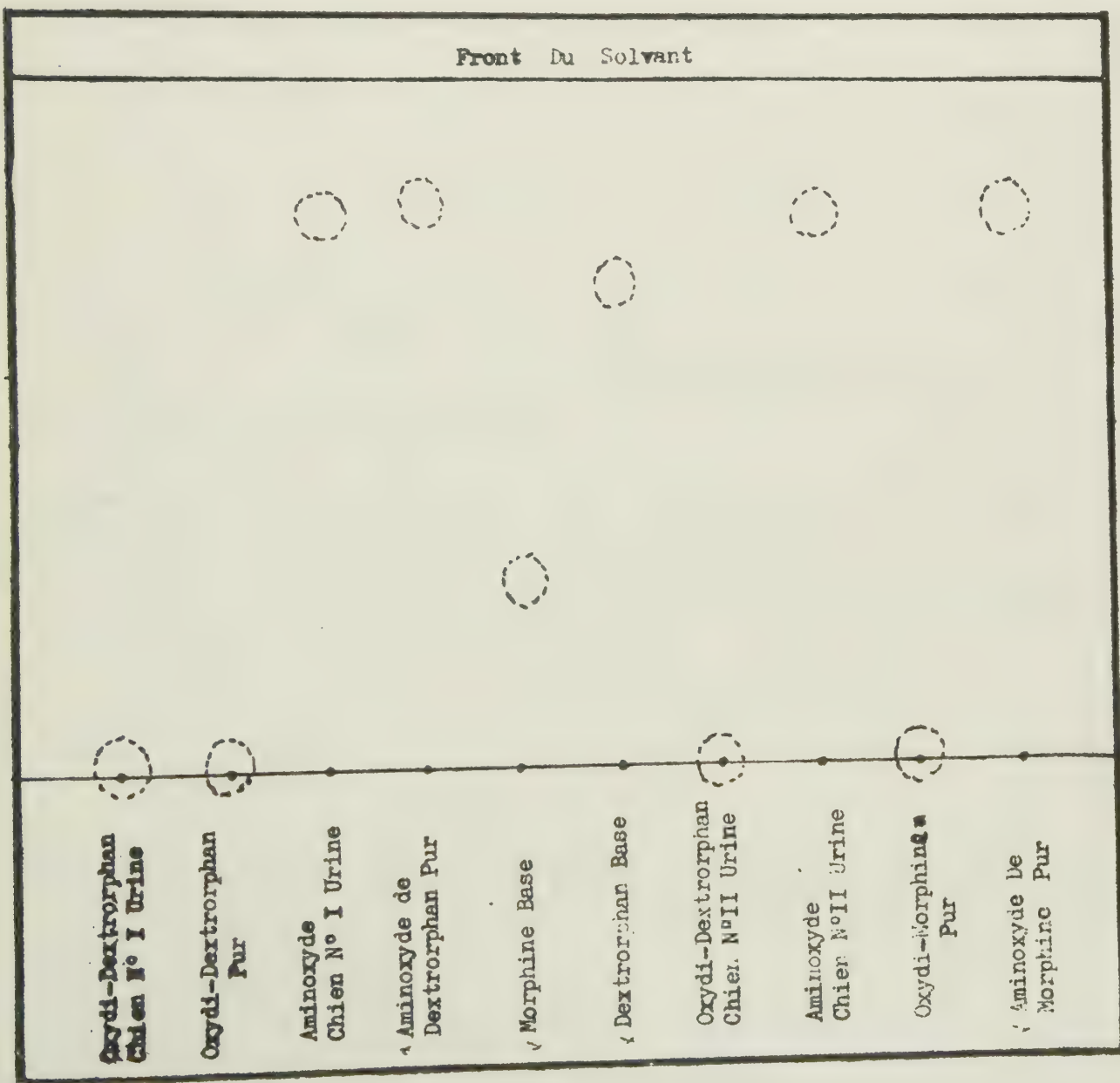
Le dextrorphan base ainsi que les autres bases témoins, que nous avons choisies, vont être chromatographiées. Pour cela nous reprenons le résidu d'évaporation par du chloroforme, puis on dépose sur papier WHATMANN N° 1 phosphaté, puis séché suivant la méthode de MUNIER (51) (solution de phosphate mono potassique M/5 : 272 g /litre). On développe la bande chromatographique par voie ascendante avec le butanol saturé d'eau, à la température du laboratoire. On laisse migrer 12 à 15 h. puis on révèle les bandes par divers réactifs.

Morphine base	Rf	0,17	Aminoxyde Chien n°II urine	0,68
Dextrorphan base		0,65	Oxydi-morphine pur	pas de migration
Aminoxyde du dextrorphan		0,69	" dextrorphan pur	" " "
" de la morphine		0,68	" " urine I	" " "
" chien n°I urine		0,69	" " urine II	" " "

CHROMATOGRAMME SUR PAPIER WHATMAN N° I

Solvant : Butanol saturé d'eau - Température 21° - Révélation à l'Iode

Front Du Solvant



c) Réactifs de révélation

1 - Solution d'iode

On prépare une solution d'iode dans l'éther de pétrole à saturation et on révèle par immersion les bandes. Cette méthode adoptée par M. CHAMBON permet de mieux localiser les spots et donne des taches brun-jaune bien nettes avec ces alcaloïdes.

La bande ainsi révélée peut ultérieurement servir à d'autres différenciations, car à la longue, les taches disparaissent et la bande décolorée peut être reprise par immersion ou dans un réactif approprié.

2 - Réactif de LAFON :

Morphine	coloration vert brun
Dextrorphan	coloration violette

3 - Réactif de MARQUIS : Réaction très rapide, coloration instantanée

Morphine	coloration rose-rouge puis violet-lilas et enfin violet foncé
Dextrorphan	coloration rose-violacé virant au brun sale.

4 - Réactif de FROEHDE : Réaction spécifique de la base.

Morphine	coloration lilas
Dextrorphan	coloration violette

5 - Réactif de DRAGENDORFF : Révélation par pulvérisation qui donne des taches rouges pour la morphine et fait ressortir le dextrorphan sur un fond orange.

6 - Réaction au FERRICYANURE-FERRIQUE : utilisée par M. et P. CHAMBON, est positive par formation de bleu de Prusse (10).

Réactifs	IODE	LAFAND	MARQUIS	FROEHDE	DRAGENDORFF	FERRI-FERRIQUE
MORPHINE	Brun-jaune	Vert-brun	Rose-rouge Violet-lilas Violet foncé	Lilas	Rouge	+
DEXTROR- PHAN	Brun-jaune	Violette	rose violacé Brun sale	Violette	Rouge	+

Le papier phosphaté apporte une gêne à la réaction au ferricyanure-ferrique. par complexation du fer. M. et P. CHAMBON ont proposé la technique suivante :

L'immersion de la bande dans une solution extemporanée de chlorure ferrique alcoolique (chlorure ferrique 0,20 g. - alcool absolu 3 - éther exempt de peroxydes 15) puis séchage 1 à 2 minutes et enfin immersion et pulvérisation d'une solution extemporanée alcoolique de ferricyanure de potassium permettant de révéler la tache bleu de Prusse de l'alcaloïde phénolique.

D - IDENTIFICATION DU DERIVE DE CONJUGAISON DU DEXTROPHAN DANS LES URINES

L'existence d'une forme conjuguée, hydrosoluble par les acides à chaud, était démontrée. Il est intéressant d'identifier sa nature qui est vraisemblablement glycuronique, étant donné les travaux antérieurs sur la morphine. Cette identification nécessite la purification de la forme conjuguée, puis la caractérisation de l'alcaloïde lui-même après hydrolyse, et enfin la molécule entrant en jeu dans cette conjugaison.

a) Isolement de la forme conjuguée

Cet isolement sera réalisé par chromatographie sur colonne de cellulose. L'urine du chien n° 1 est ajustée à pH 7,4 par le bicarbonate de sodium, puis triturée au mortier avec 3 g. d'uréase, afin de détruire l'urée gênante. On abandonne le mélange 1 h. $\frac{1}{2}$ à l'étude à 37°. On laisse refroidir, centrifuger et filtrer. Le filtrat est concentré à la température de 50 à 60° à 20 ml environ, dans le vide, puis le liquide est desséché dans un dessiccateur à acide sulfurique.

Avec une allonge de 17 mm de diamètre intérieur et 760 mm. de hauteur, nous préparons une colonne à chromatographie (77) avec de la poudre de cellulose pour chromatographie (92). On place un tampon de verre à la partie inférieure de la colonne, et la bouillie de poudre de cellulose préparée dans un mélange de n-butanol-acide acétique eau (40-10-20) est versée dans la colonne pour avoir une hauteur de 37 à 40 cm après tassement spontané de la poudre. Pour cela, on laisse couler le mélange par la partie inférieure, tout en gardant un peu du mélange à la partie supérieure de la colonne, pour éviter la dessiccation à l'air de la poudre.

On triture avec 30 ml du mélange éluant précédant, l'extrait urinaire desséché puis centrifugé. Le liquide surnageant est versé sur la colonne et on développe une pression de 7 à 8 cm de mercure avec le mélange éluant environ d'un mètre. On rejette les 105 premiers ml. et l'on recueille 150 ml suivants. Cette solution est évaporée à sec à environ 50° par distillation sous pression réduite. Le résidu est épuisé avec deux fois 2 ml. d'eau distillée, puis centrifugé. Ce liquide est traité par 20 ml de méthanol froid, puis centrifugé pour éliminer le dépôt salin qui a pu se former. Le liquide surnageant est décanté puis évaporé à sec et le traitement est renouvelé. On traite à ébullition pendant 5 minutes le résidu sec précédent avec 20 ml de méthanol. Ce dernier est séparé et le traitement est renouvelé. On réunit les 2 solutions méthanoliques évaporées sous pression réduite. Le résidu est solubilisé dans 4 ml. d'eau additionnée de 10 ml de méthanol. On centrifuge, sépare et concentre le liquide surnageant.

Sur papier WAHTMANN N° 1, ce liquide est chromatographié avec le solvant suivant :

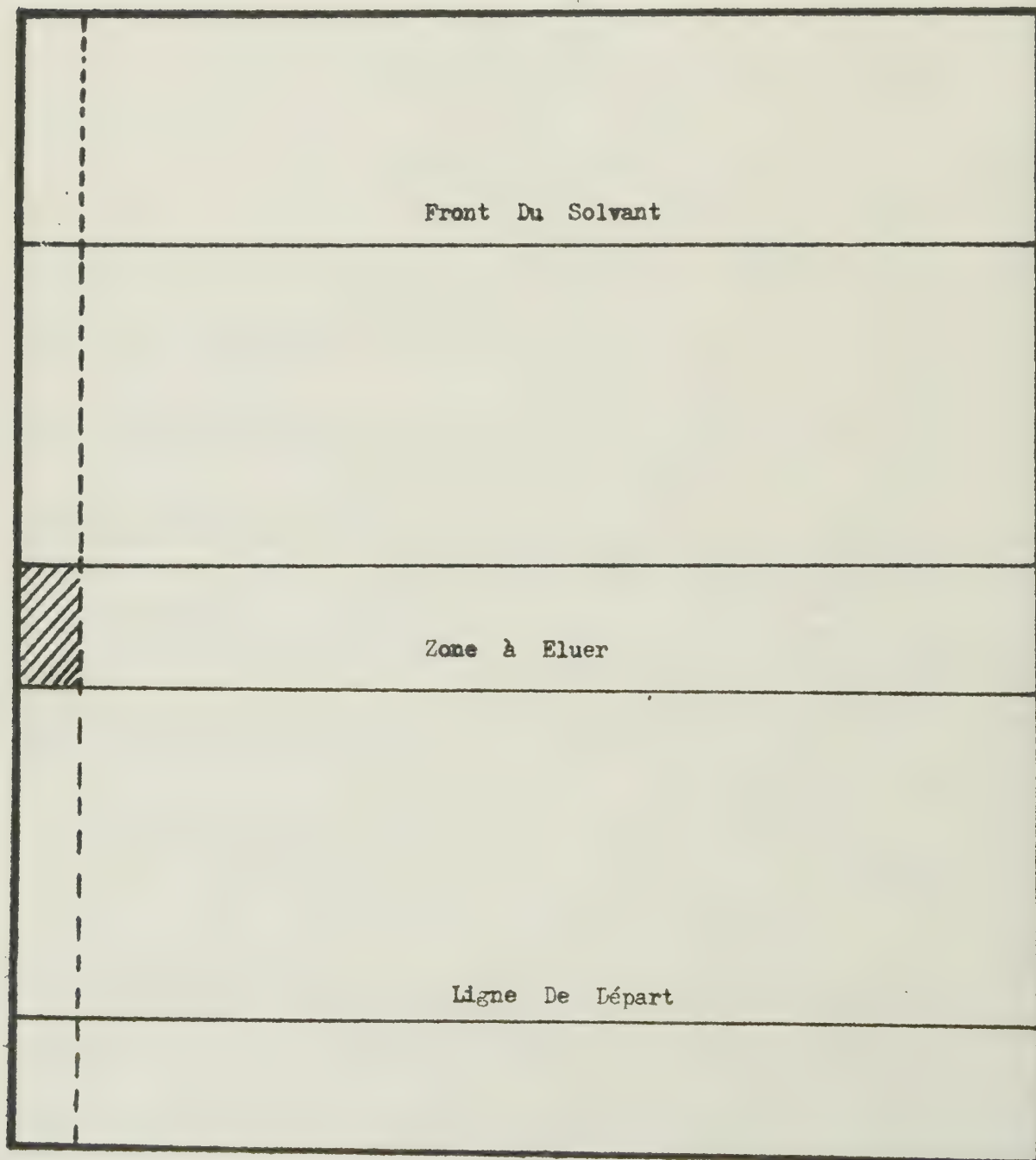
n-butanol	10
acide acétique	3
eau	4,5

On dépose la solution sur toute la largeur de la bande sèche et développe par voie ascendante avec le solvant ci-dessus. On laisse migrer 15 h., puis révélation d'une fine bande découpée sur la longueur du chromatogramme à l'iodine.

Chromatogramme sur papier WHATMAN N° I

Solvant : n-Butanol. Acide Acétique, Eau (10 - 3 - 4,5).

Révélation à l'iode d'une bande de 1 cm de large pour situer la zone à éluer de $R_f = 0,39$



Ainsi, nous avons mis en évidence un spot de $R_f = 0,39$.

On découpe la bande correspondante à ce $R_f = 0,39$ puis on élue avec de l'eau distillée. L'éluat est concentré et un deuxième chromatogramme est effectué de façon à purifier et isoler la forme conjuguée uniquement au $R_f = 0,39$; la zone occupée par la migration alcaloïdique est enfin éluee.

b) Identification de la forme conjuguée

Nous allons procéder pour la caractérisation de cette forme de conjugaison à deux étapes :

- Mise en évidence du groupement basique
- Caractérisation par 2 méthodes différentes de la partie conjuguée.

1 - Caractérisation du groupement basique

L'hydrolyse acide de la forme conjuguée est réalisée de la façon suivante : le tiers de l'éluat est additionné de 1/10e de son poids d'acide chlorhydrique concentré, et placé à l'autoclave pendant 30 minutes à 120° , puis extrait l'alcaloïde libéré par du chloroforme alcoolique en milieu alcalin suivant la technique précédemment décrite. On concentre le chloroforme à 30° et le résidu repris est déposé sur une bande de papier WHATMANN N° 1 phosphaté selon MUNIER. On développe par le butanol saturé d'eau, on laisse migrer 15 h. puis le produit est identifié par le R_f et ses réactions colorées. On caractérise ainsi l'hydroxy-3 N-méthyl-morphinan.

2 - Caractérisation de la molécule conjugante

Le deuxième tiers de l'éluat est soumis à 2 méthodes différentes qui nous permettent d'identifier la nature de la partie conjugante, par la révélation et les dosages de l'acide glycuronique libre et l'acide glycuronique des glycuronides : ce sont d'une part la méthode de DISCHE (18) et d'autre part la méthode de FISHMAN (22).

- Méthode de DISCHE

Une partie aliquote de la solution susceptible de contenir l'acide glycuronique, ou les glycuronides est chauffée avec l'acide sulfurique concentré au bain-marie bouillant. Le mélange est ensuite refroidi à la température du laboratoire, puis additionné de 0,2 ml d'une solution alcoolique à 0,1 % de carbazole pur. Une agitation est nécessaire. Après quelques minutes une coloration rose apparaît en présence d'acide glycuronique libre ou lié, qui s'intensifie pendant 2 h. et reste stable au moins 1 h., puis diminue lentement en perdant au moins le tiers de son intensité après 24 h. On passe au colorimètre à 530 m μ .

DISCHE s'est basé sur cette réaction pour établir le dosage colorimétrique de l'acide glycuronique total (libre et lié).

- Méthode de FISHMAN

Principe

L'acide glycuronique est éliminé d'un mélange d'acide libre et de glycuronides, en oxydant le groupement aldéhyde libre par l'hypo-iodite à

pH 10,1, ce qui aboutit à la formation d'acide saccharidique insensible à la réaction au naphto-resorcinol (25-85).

Les glycuronides ne sont pas touchés par ce traitement car le groupement aldehyde du carbone 1 est protégé par sa liaison à l'aglycone. Par la suite, les conditions fortement acides dans lesquelles se fait la réaction au naphto-resorcinol libère un pigment violet dont l'intensité colorée est proportionnelle à la quantité d'acide glycuronique libre.

Réactifs

- Toluène
- alcool éthylique à 95°
- tampon pH 10,1

bicarbonate de sodium	8,4 g
carbonate de sodium anhydre	36 g
eau distillée	1000 ml
- solution d'iode 0,1 N
- solution de bi-sulfite de sodium M
- acide sulfurique 6 N
- " " 18 N
- solution aqueuse de Naphto-resorcinol à 0,4 %

Appareillage

Spectrophotomètre électronique JOBIN-YVON

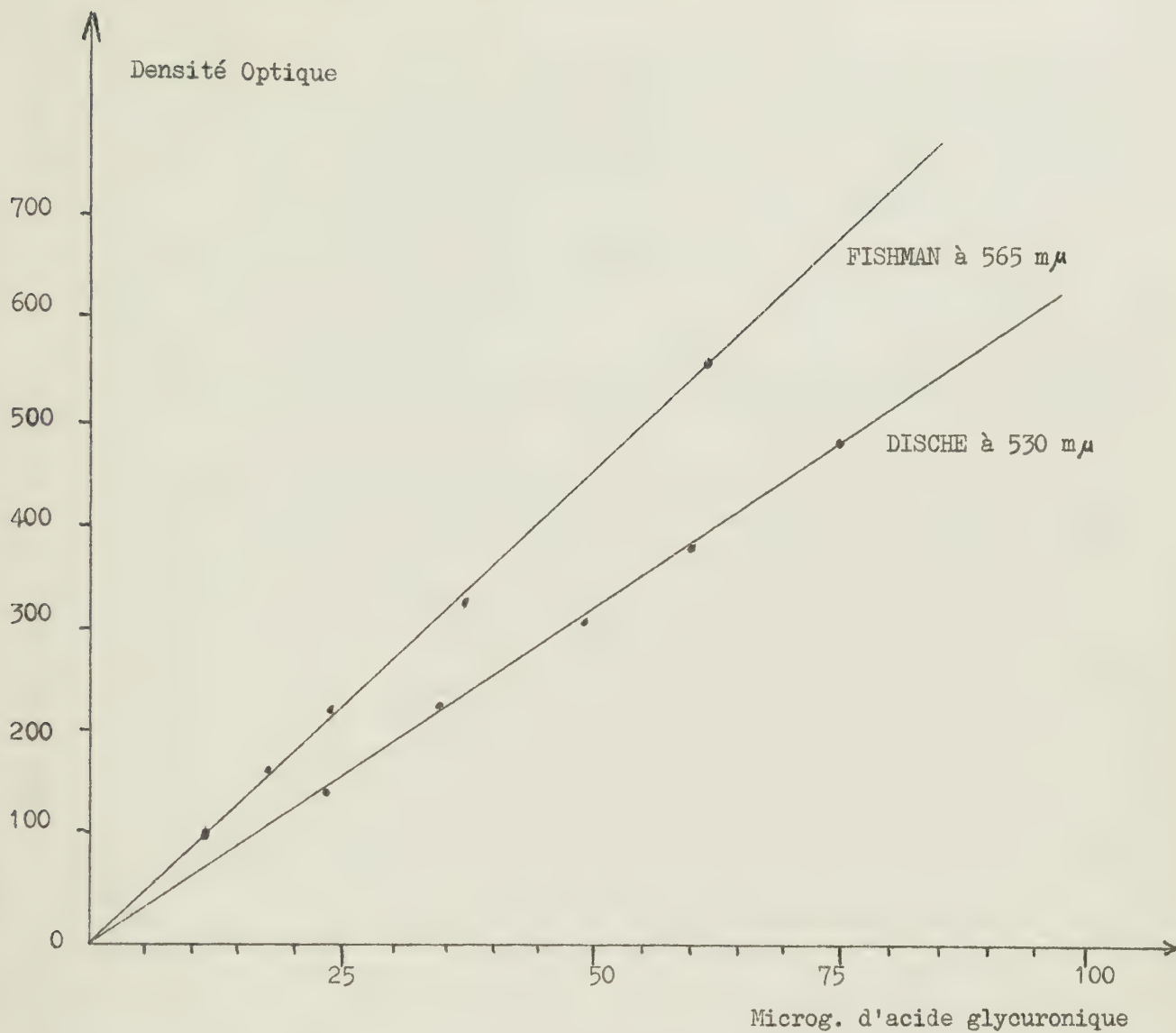
Mode opératoire

Une partie aliquote de solution à expertiser (5 ml) est additionnée de 2,05 ml de tampon, et de 1,5 ml d'iode 0,1 N. On agite et on porte le mélange 30 minutes à l'obscurité. On ajoute alors 0,15 ml de solution de bi-sulfite de sodium M et 0,3 ml d'acide sulfurique 6 N. S'il reste une coloration due à l'iode, on la fait disparaître avec une goutte de solution de bisulfite de sodium M.

Deux parties aliquotes (4 ml) sont pipettée dans des tubes à essai puis additionnées de 2 ml de naphto-resorcinol à 0,4 % et de 2 ml d'acide sulfurique 18 N. On porte au bain-marie à 100° pendant 30 minutes. Après refroidissement, on ajoute 10 ml d'alcool éthylique à 95° pour dissoudre le pigment, puis 8 ml de toluène. On agite soigneusement, la liqueur aqueuse est pipettée et les extraits toluéniques sont recueillis. On mesure la densité optique de la solution toluénique au spectrophotomètre dont le maximum d'absorption est à 565 m μ .

Etalonnage

L'étalonnage de cette réaction colorée s'effectue sur des solutions contenant de l'acide glycuronique à des doses croissantes par ml. Le protocole de dosage est le même. La densité optique est fonction de la concentration de l'acide glycuronique. Nous avons pu dresser une courbe de dosage qui est une ligne droite (voir page suivante).



Densité optique en fonction de la concentration en acide glycuronique

Méthode de DISCHE		Méthode de FISHMANN	
Densité Optique	Acide Glycuronique	Densité Optique	Acide Glycuronique
120	22,5 Microgrammes	101	10 Microgrammes
215	35 "	145	14,5 "
340	54,5 "	210	21,5 "
670	96 "	365	35 "

Densité Optique mesurée au Spectrophotomètre électronique : JOBIN-YVON

Pour plus de sécurité, nous avons vérifié la sensibilité de ces deux méthodes, par des dosages de bornéol-glycuronide. Pour cela nous avons administré à deux chiens, séparément, du bornéol mélangé à de la viande hachée (4 g. de bornéol pendant 4 jours). Les chiens étaient mis dans des cages spéciales, de manière à recueillir les urines. Ces dernières furent ensuite traitées selon la méthode de QUICK (60-11).

Nous avons déféqué les urines au réactif de COURTON. Le filtrat est additionné d'acétate de zinc à l'ébullition qui précipite le bornéol-glycuronique en bornéol-glicuronate de zinc. On lave le précipité, on le sèche, puis on le dissout dans l'acide sulfurique à chaud. On obtient après refroidissement du bornéol-glycuronide cristallisé, qu'on recristallise de nouveau dans l'eau chaude. Ainsi, les deux méthodes étaient vérifiées et nous ont montré une sensibilité satisfaisante.

Après toutes ces opérations, il nous a paru que les 2 méthodes étaient très sensibles, quant à la détection de l'acide glycuronique de l'essai expérimental au bornéol-glycuronide qu'au dosage du glycuronide de l'hydroxy-3 N-méthyl-morphinan (dextrorphan).

De plus, la réaction positive au ferrycyanure ferrique sur le glycuronique séparé à l'état pur nous a donné des renseignements sûrs. Donc, nous concluons que la fonction phénol responsable de cette réaction était bloquée par la fixation de l'acide glycuronique sur ce point.

CHAPITRE III

HYDROLYSE DE LA FORME CONJUGUEE PAR LA β GLYCURONIDASE

Parallèlement à l'hydrolyse acide, nous avons essayé l'hydrolyse enzymatique par la β glycuronidase (2) pour situer son efficacité et savoir exactement à quel point cette hydrolyse pouvait se poursuivre.

Sur 7 ml d'urine ajustée à pH 5, on ajoute 10.000 unités de β glycuronidase. La solution est additionnée de 5 ml de tampon acéto-acétique (Acétate de sodium cristallisé, 3 H 20 - Acide acétique - Eau) et le mélange est incubé 24 h. à l'étuve à 37°. On centrifuge et le liquide surnageant subit la même extraction que l'hydrolyse acide.

Sur l'extrait chloroformique, nous avons procédé, d'une part à un chromatogramme selon la méthode de MUNIER sur papier phosphaté WHATMANN N° I, et d'autre part, nous avons dosé l'acide glycuronique libéré selon la méthode de FISHMAN. Nous avons obtenu les résultats suivants :

Densité optique en fonction de la concentration en acide glycuronique (Hydrolyse enzymatique).

Méthode de FISHMAN	
Densité optique	Acide Glycuronique
100	8,5 Microgrammes
140	11,5 "
210	17 "
360	28,5 "

Densité optique mesurée à l'électrophotomètre électronique JOBIN-YVON

Avant de commencer ce dosage, nous avons pratiqué la réaction au ferri-cyanure ferrique afin de s'assurer que la fonction phénol était bien bloquée avant l'hydrolyse par l'acide glycuronique, et qu'après, elle est devenue libre. Ainsi, nous avons pu constater que dans le premier cas, la réaction au ferricyanure ferrique était négative, d'où blocage de la fonction phénol, et positive dans le deuxième cas, d'où libération de cette fonction.

Par comparaison des résultats obtenus par cette hydrolyse enzymatique, avec ceux obtenus par hydrolyse acide, et pour **les** mêmes quantités d'urine initiales, nous pouvons dire que l'hydrolyse acide **était** plus efficace que l'hydrolyse enzymatique, car pour des densités optiques à peu près identiques la concentration en acide glycuronique était plus faible.

Bien entendu, nous n'avons pu faire le dosage de l'alcaloïde libéré, uniquement de l'acide glycuronique ou d'autre **forme**. Plusieurs auteurs pensent que cette conjugaison pouvait être sous une autre forme, et de ce fait l'hydrolyse acide libérerait plus d'alcaloïde que l'hydrolyse enzymatique.

Aussi nous pouvons dire, que l'hydrolyse enzymatique est assez efficace même qu'elle est inférieure à l'hydrolyse acide pour détruire cette forme d'élimination d'un toxique qu'est la forme conjuguée, et qu'en aucun cas, il faut bien tenir compte de cette hydrolyse dans le courant d'une expertise toxicologique, spécialement si le prélèvement destiné à cet usage était abandonné un certain temps avant de commencer l'analyse.

Nous avons aussi pratiqué une chromatographie sur papier WHATMAN N° I phosphaté et par comparaison avec le chromatogramme de l'éluat acide nous avons obtenu des Rf **identiques**.

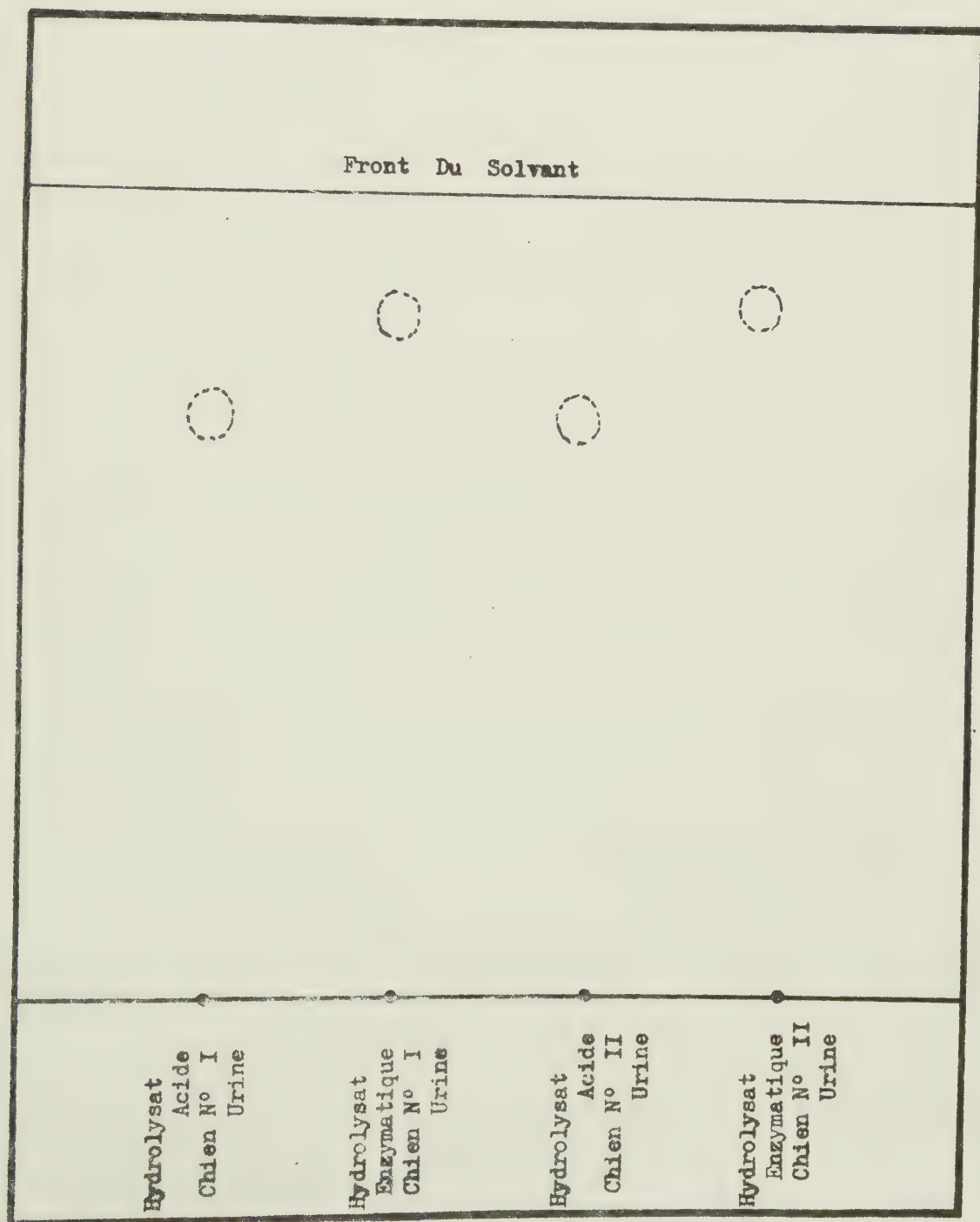
Hydrolysats	acide	urine	I	Rf	0,87
"	"	"	II		0,88
"	enzymatique	urine	I		0,88
"	"	"	II		0,88

(page suivante : chromatogramme comparatif des hydrolysats acide et enzymatique)

Chromatogramme sur papier phosphaté WHATMAN N° I

Solvant : Butanol saturé d'eau. Température 21°

Révélation à l'iode



DISCUSSION

Aborder actuellement un problème d'étude du métabolisme d'une molécule organique pourrait paraître bien présomptueux, si l'on ne peut disposer des ressources qui se sont avérées indispensables pour découvrir et suivre le devenir des produits de transformations, la configuration de la molécule initiale, à travers l'organisme.

Des travaux modernes ont révélé constamment la richesse exceptionnelle que peut apporter le marquage des molécules par des isotopes radioactifs, qui servent ensuite de traceurs dans cette évolution des métabolites.

Plus simplement même, il n'est pas jusqu'à l'abondance et à la diversité des espèces animales en expérience qui ne puissent paraître indispensables pour prétendre apporter des conclusions d'une ampleur significative.

Notre but, nos possibilités étaient plus simples.

C'est davantage sous l'angle toxicologique qu'a été conduit ce travail, bien que la toxicologie classique soit en fait l'un des chapitres ultimes de la pharmacodynamie, qui fut bien développée avant que celle-ci ne fut connue.

En effet, nous avons rappelé comment la synthèse chimique organique dans une réussite générale a pu aboutir à créer un alcaloïde analgésique nouveau inspiré de cette molécule polycyclique compliquée qu'est la morphine, que réalise étonnamment le pavot.

Cet alcaloïde nouveau, le morphinan, à la suite d'une série d'études systématiques cliniques et pharmacodynamiques pouvait être convenablement substitué pour aboutir à une réplique améliorée de la morphine modèle : l'hydroxy-3 N-méthyl morphinan.

Cet effort conjugué des organiciciens et des pharmacologues révélait encore avec une netteté frappante l'influence extraordinaire de la disposition stéréochimique pour l'action physiologique de ces molécules.

Le produit racémique issu de la synthèse pouvait être simplement dédoublé en ses deux antipodes optiques. Or tandis que l'un des énantiomorphes, le lévorphan, ou Dromoran (Hoffmann-La-Roche) possède une activité analgésique supérieure, exaltée par rapport à la morphine, et les caractères plus atténués de la propension à la toxicomanie, l'autre énantiomorphe, dextrogyre, le dextrophan n'est pour ainsi dire point analgésique mais manifeste d'intéressantes propriétés inhibitrices du réflexe de la toux. Celles-ci sont considérablement amplifiées par la méthylation de l'hydroxyle 3 et le dextrométorphan ainsi synthétisé apporte à la thérapeutique un antitussif remarquable (Romilar Roche) et à la synthèse un débouché rentable.

Dans la rapide revue que nous avons rédigée de ces efforts conjoints des organiciens et des pharmacologistes, nous avons pensé évoquer l'étonnante conversion qu'apporte la toute simple substitution du radical allyl - $\text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH}_2$ au groupement méthyl - CH_3 fixé à l'azote du noyau isoquinoléine.

Cette seule substitution qui transforme la molécule N - méthylée en N - allylée, la transforme sur le plan physiologique en antagoniste puissant de l'alcaloïde N - méthylé, et surtout dans ses propriétés toxiques sur le centre respiratoire.

C'est une confirmation des découvertes antérieures qui par un minime réarrangement moléculaire font de la N - allyl - Normorphine (nalorphine) de la N - allyl - Norcodéine, comme de l'hydroxy - 3 Nallyl morphinan (Lévallorphan) de précieux antagonistes des propriétés dépressives respiratoires responsables de la plupart des cas provoqués par la morphine et ses deux dérivés.

Quelle voie royale ouverte à l'investigation sur les relations centre physiologique récepteurs - enzymes responsables des métabolismes neuronaux et constitution chimique.

Cette parenté étroite entre les alcaloïdes dérivés de la morphine et ceux du morphinan, devait probablement se prolonger dans leur comportement métabolique général.

Dès lors les enquêtes toxicologiques qui sont trop souvent la conséquence du développement de la toxicomanie engendrée par la morphine ou son dérivé acétylé l'héroïne, risquent fort de s'imposer un jour pour certains dérivés du morphinan.

Nous avons évoqué les travaux de l'école de WOODS notamment poursuivis sur le dosage et les formes d'élimination de la morphine davantage dans le cadre de recherches pharmacologiques.

Dans ce même esprit, des recherches entreprises par FISCHER et LONG, ZAGER et ses col. puis FROMHERZ sur le Dromoran, ont établi de solides bases sur le comportement de ses énantiomorphes à travers l'organisme de l'animal d'expérience.

C'est un travail dans la même orientation que nous nous sommes efforcé de conduire dans le sillage des travaux de laboratoire de notre Maître Monsieur le Professeur M. CHAMBON.

Il fut conduit en effet à l'occasion d'une expertise toxicologique à étudier de nouvelles méthodes de recherche de la morphine, et diriger dans la même voie ceux de notre ami H. CRETIN sur le Dilaudid et l'Eukodal.

Nous condenserons ici pour les confronter avec les apports antérieurs les observations et résultats obtenus.

Nous avons d'abord vérifié que les méthodes d'extraction et de dosage de la morphine, établies selon WOODS, puis par M. et P. CHAMBON étant applicables au α -hydroxy-3 N-Méthylmorphinan, dextrorphan énantiomorphe dextrogyre du Dromoran, qui a fait l'objet de notre étude, n'ayant pu nous procurer en France le 1-hydroxy-3 N-Méthylmorphinan, où il est interdit.

Cependant deux éléments essentiels nous paraissent intéressants à souligner dans cette discussion :

1) La confrontation dans le protocole d'une expertise toxicologique des deux méthodes, la première, ancienne, mais classique et générale (Méthode de STAS-OTTO-OGIER-VOHM ARREST); la seconde, récente mais spécifique (M. et P.

CHAMBON) permet d'analyser les avantages et les inconvénients de ces méthodes.

2) Etant donné la nouveauté du produit (dextrorphan) nous allons essayer de montrer le parallélisme existant en confrontant nos résultats avec ceux des auteurs antérieurs, et dégager de cette comparaison le rôle essentiel du temps écoulé entre l'injection du produit et le prélèvement des pièces d'analyse après le sacrifice de l'animal.

Sur le plan toxicologique, il est plus logique et bien évident que le choix de la méthode tient une place primordiale. Nous avons vu que la méthode de STAS doit être toujours appliquée en totalité à chaque fois qu'il y a une expertise toxicologique. Mais étant donné sa défaillance complète dans la recherche et le dosage de la forme conjuguée du toxique, il est nécessaire de palier cette insuffisance : soit par la réalisation d'une hydrolyse acide sur les liqueurs aqueuses considérées comme épuisées, soit par l'application en parallèle de la méthode de M. et P. CHAMBON.

Cette dernière tient sa place surtout à sa grande spécificité dans le dosage de la forme conjuguée. Nous avons pu montrer par les dosages de cette forme que la méthode de M. et P. CHAMBON nous permet de retrouver le toxique non seulement sous sa forme libre mais aussi sous sa forme conjuguée glycuronique. Cela nous permet d'ouvrir une parenthèse, car nous avons montré aussi malgré toutes les précautions prises, telles que la conservation au réfrigérateur des prélèvements en attendant le dosage, l'hydrolyse enzymatique par les glycuronidases locales, n'est pas arrêtée, et de ce fait les pourcentages des deux formes libre et conjuguée étaient modifiée. D'autre part la spécificité du dosage de la forme conjuguée peut être un argument en faveur de la pénétration du toxique dans l'organisme et éventuellement du délai écoulé entre la pénétration et le décès. Mais si le prélèvement n'est effectué que plusieurs jours après le décès ou si le cadavre est exhumé, les formes conjuguées auront pu disparaître en partie ou en totalité, limitant la portée des conclusions.

Ainsi avons-nous pu observer que dans les solutions aqueuses résiduelles de la méthode de STAS étaient encore présentes les formes hydrosolubles conjuguées du dextrorphan, et par isolement chromatographique nous avons pu isoler les glycuronides. Ceux-ci de même que la fraction aqueuse dont ils furent isolés, après hydrolyse acide, ou à la β glycuronidase libérant d'une part l'alcaloïde, d'autre part l'acide glycuronique.

Nous avons rapporté ici les résultats d'alcaloïdes ainsi récupérés sur les solutions considérées comme épuisées dans le protocole de STAS.

Résultats obtenus des liquides résiduels déjà épuisés
selon STAS (queue de STAS)

	dextrorphan conjugué
Bile	976 microg.
Urines	874 "
Foie	40 "

Le deuxième point essentiel de notre discussion, repose d'une part sur la confrontation de nos résultats relatifs à des délais différents de prélèvements après l'injection, et d'autre part avec ceux obtenus par les auteurs, d'où

ressort la signification du délai écoulé entre l'administration de l'alcaloïde et le décès, ou le prélèvement des produits biologiques.

Précisant d'abord que dans nos expériences, les doses injectées relativement faibles, se rapprochent des doses thérapeutiques, et il est bien évident, que plus la dose injectée est élevée, plus les pertes inhérentes aux méthodes de dosage sont faibles, c'est-à-dire une certaine élévation des quantités recueillies.

Si nous comparons les pourcentages obtenus dans nos deux expériences, nous pouvons dire que les deux voies majeures de cette élimination sont la bile et l'urine.

L'étude que nous avons faite pour l'élimination biliaire permet de montrer que d'une part les prélèvements effectués 9 h. après l'injection du chlorhydrate de dextrorphan contiennent près de 11 % de la quantité totale injectée, surtout sous la forme conjuguée (10,4 %). Mais si le prélèvement est effectué plus longtemps après, 17 h., il ne reste plus dans la bile qu'un pourcentage très réduit d'alcaloïde injecté, 0,59 %, entièrement sous forme conjuguée. Cela laisse supposer que l'organisme est apte à conjuguer encore les dernières quantités d'alcaloïde libre, soit en circulation, ou fixées sur certains organes.

Elimination du dextrorphan exprimé en <u>pourcentage</u> de la dose injectée					
Chien N° I - 13,500 Kg			Chien N° II - 10,500 Kg		
2,225 mg/Kg en s.c.			2,85 mg/Kg en s.c.		
9 h. ←———— Délai de prélèvement ———→ 17 h.					
	Formes			Formes	
	Libre	Conjug.		Libre	Conjug.
	Bile	0,99 10,40		0 0,59	
	Urine	3,90 4,62		1,54 20,85	
	4,89	15,02		1,54	21,44
Total —————→		19,91 %	22,98 %		

Nous ne connaissons pas d'autres travaux qui aient été publiés sur l'élimination biliaire du dextrorphan.

Cependant les résultats obtenus par H. CRETIN sur le Dilaudid présentent d'étroites analogies avec les nôtres.

Nous tenons d'autre part à remarquer la proportion importante d'alcaloïde récupérable dans la bile au moins lorsque la mort de l'animal est survenue avant les 9 h. de l'administration.

Dans le cas de l'Eukodal, H. CRETIN a trouvé 16 h. après l'injection des quantités équivalentes d'alcaloïde. On retrouvait dans la bile uniquement 1 a forme conjuguée (1,83 % d'alcaloïde), ce qui laissait à penser que cette élimination biliaire est assez retardée, ceci paraît concorder avec l'élimination bien plus faible dans les urines 4,96 % de la dose totale injectée; mais ici en majorité libre. Nous pourrions en rapprocher utilement les éliminations de la morphine qui dans les prélèvements effectués 8 h. après l'injection contiennent 16 % de la quantité injectée dont 15,15 % à l'état conjugué.

B I L E

Morphine = Résultats de WOODS (89)

Chien sacrifié 6 h. après l'injection s.c. de 30 mg/Kg de chlorhydrate de morphine.

Morphine libre	1,7 % de la dose injectée
" conjuguée	15 % " " " "

= Résultats de M. et P. CHAMBON (10)

Chien sacrifié 8 h. après l'injection s.c. de 7,5 mg/Kg de chlorhydrate de morphine.

Morphine libre	0,85 % de la dose injectée
" conjuguée	15,15 % " " " "

Dilaudid = Résultats de H. CRETIN (10 bis)

Chien sacrifié 9 h. après l'injection s.c. de 2,05 mg/Kg de chlorhydrate d'hydromorphone

Dilaudid libre	0,058 % de la dose injectée
" conjugué	9,91 % " " " "

Chien sacrifié 16 h. après l'injection s.c. de 3,07 mg/Kg

Dilaudid libre	0 % de la dose injectée
" conjugué	0,58 % " " " "

Eukodal = Chien sacrifié 16 h. après l'injection s.c. de 2,11 mg/Kg de chlorhydrate de dihydrone

Eukodal libre	0 % de la dose injectée
" conjugué	1,83 % " " " "

Dextrorphan = Résultats personnels

Chien sacrifié 9 h. après l'injection s.c. de 2,225 mg/Kg de chlorhydrate de dextrorphan.

Dextrorphan libre	0,99 % de la dose injectée
" conjugué	10,40 " " " "

Les résultats obtenus sur les urines confirment et au-delà cette activité. Ainsi nous constatons que le pourcentage de la forme libre diminue de 3,9 % après 9 h. à 1,54 après 17 h. dans le cas du dextrorphan, et cède sa place à la forme conjuguée 4,62 à 20,85 %.

Les résultats suivants nous montrent encore à quel point le temps peut jouer un rôle capital dans l'élimination du produit sous sa forme conjuguée.

U R I N E

=====

Morphine = Résultats de WOODS

Chien sacrifié 9 h. après l'injection s.c. de 20 mg/Kg de chlorhydrate de morphine.

Morphine libre	16 %	de la dose injectée	
" conjuguée	38 %	" " " "	

= Résultats de M. et P. CHAMBON

Chien sacrifié 8 h. après l'injection s.c. de 7,5 mg/Kg de chlorhydrate de morphine.

Morphine libre	22 %	de la dose injectée	
" conjuguée	32 %	" " " "	

Dilaudid = Résultats de H. CRETIN

Chien sacrifié 9 h. après l'injection s.c. de 2,05 mg/Kg de chlorhydrate d'hydromorphone.

Dilaudid libre	3,4 %	de la dose injectée	
" conjugué	6,96 %	" " " "	

Chien sacrifié 16 h. après l'injection s.c. de 3,07 mg/Kg

Dilaudid libre	1,85 %	de la dose injectée	
" conjugué	23,35 %	" " " "	

Racémorphan = Résultats de FISCHER et LONG

Sur une période de 24 h. sans sacrifier le chien
Injection de 10 mg/Kg en I.M.

Racémorphan libre	4,1 %	de la dose injectée	
" conjugué	10,7 %	" " " "	

Dextrorphan = Résultats personnels

Chien sacrifié 9 h. après l'injection s.c. de 2,225 mg/Kg de chlorhydrate de dextrorphan.

Dextrorphan libre	3,9 %	de la dose injectée	
" conjugué	4,62 %	" " " "	

Chien sacrifié 17 h. après l'injection s.c. de 2,85 mg/Kg

Dextrorphan libre	1,54 %	de la dose injectée	
" conjugué	20,85 %	" " " "	

Cette accumulation des formes conjuguées dans l'urine notamment, en fonction du temps de survie de l'animal, laisse penser au rôle prolongé du foie dans la conjugaison. Peut-on invoquer une circulation entérohépatique ou une libération progressive de l'alcaloïde principalement fixé sur quelques organes et passant alors à travers le foie, au fur et à mesure de leur déversement dans la circulation générale ? Nos expériences ne nous permettent pas encore de conclure.

C O N C L U S I O N S

Parmi les alcaloïdes doués de propriétés analgésiques centrales, une place importante est acquise par un dérivé synthétique morphinoïde : l'Hydroxy-3 N-méthylmorphinan. La synthèse récente conduit à deux énantiomorphes. Tandis que l'isomère lévogyre, lévorphane (Dromoran) est hautement analgésique et porte les caractéristiques des stupéfiants, l'isomère dextrogyre, dextrophan est dépourvu de propriétés pharmacodynamiques marquées, mais son dérivé 3-méthoxylé, dextrométorphan (Romilar) possède une action thérapeutique antitussive marquée.

Nous avons pensé étudier le métabolisme dans l'organisme animal, du dextrophan; son antipode, le lévorphane étant interdit en France.

Dans une première partie, nous avons rappelé les synthèses chimiques de ces alcaloïdes et leurs propriétés physico-chimiques et pharmacologiques.

Notre travail personnel effectué surtout sous l'angle toxicologique s'est inspiré des travaux antérieurs accomplis dans le laboratoire de notre Maître Monsieur le Professeur M. CHAMBON, selon des méthodes plus actuelles sur d'autres alcaloïdes morphiniques, et visant notamment les formes conjuguées retrouvées dans les organes et surtout les produits d'élimination.

1° - Nous avons montré la possibilité du dosage correct spectrophotométrique du dextrophan, selon la méthode de BRODIE avec des quantités de l'ordre de 5 microg. /ml à 50 microg. /ml par complexation de l'ester p -nitrobenzoïque du dextrophan avec le méthyl orange au sein du 1-2 dichloro-éthane.

Nous avons défini les Rf respectifs du dextrophan, de l'oxydidextrophan, de l'aminoxyde du dextrophan que nous avons confronté avec les dérivés correspondants de la morphine par chromatographie sur papier WHATMAN N° I phosphaté de MUNIER et développement au n-butanol saturé d'eau.

2° - Afin de demeurer dans l'ordre de grandeur des intoxications accidentelles, nous avons injecté par voie s.c. aux chiens des quantités assez faibles de dextrophan de l'ordre de 2 mg/Kg. Pour essayer de préciser l'évolution du métabolisme de l'alcaloïde, nous avons sacrifié l'un des animaux 9 h. après l'administration du produit et l'autre 17 h. après.

Nous avons immédiatement prélevé aux fins d'analyse l'urine contenue dans la vessie, et celle qui fut émise pendant l'absorption, le sang, le foie en isolant spécialement la vésicule biliaire, le tube digestif (estomac et intestins) et son contenu et les reins.

3° - Nous avons conduit parallèlement sur ces divers prélèvements la recherche des alcaloïdes selon la classique méthode de STAS-OTTO-OGIER-KOHN-ABREST et selon la méthode de M. et P. CHAMBON adaptée de celle de WOODS.

Selon la méthode de M. et M. CHAMBON comportant une désalbumination trichloracétique, et une hydrolyse à l'autoclave nous avons pu doser la forme libre du dextrorphan et la forme conjuguée hydrolysable connue, différence entre les quantités d'alcaloïde libre et d'alcaloïde total.

La méthode de Stas ne nous a permis de retrouver que les seules formes libres. Cependant, nous avons constaté que les formes conjuguées hydrolysables se trouvaient dans la phase aqueuse terminale, épuisée, considérée comme stérile.

Nous avons complété les informations de la méthode de STAS en soumettant à l'hydrolyse acide selon la méthode de M. et P. CHAMBON cette liqueur aqueuse déjà épuisée et nous avons pu y doser aussi des quantités de dextrorphan, initialement conjuguées, assez voisines de celles déterminées par la méthode directe.

Les dosages spectrophotométriques ont toujours été complétés par la caractérisation analytique et chromatographique sur papier phosphaté de l'alcaloïde. Il ne fut jamais décelé d'oxydextrorphan. Ce dernier, de même l'oxydimorphine n'apparaissent que comme artéfact à la suite d'erreurs de technique.

4° - Afin de définir la nature de la conjugaison principale du dextrorphan dans son métabolisme, nous avons effectué une chromatographie de l'urine selon une technique inspirée de SEIBERT et Col. comportant l'élimination préalable de l'urée par l'uréase, adsorption sur cellulose, puis élution par le mélange n - butanol - acide acétique - eau et après purification de l'extractif, enfin chromatographie sur papier et développement par le même solvant.

Le spot bien individualisé du conjugué glycuronique du dextrorphan soumis à l'hydrolyse chlorhydrique permet de caractériser et de doser le dextrorphan libéré et l'acide glycuronique par la méthode de DISCHE et de FISHMAN.

L'hydrolyse enzymatique réalisée par la glycuronidase directement sur les urines a permis par les dosages respectifs de l'alcaloïde libre et de l'acide glycuronique avant et après hydrolyse, de confirmer l'importance de cette glycu-ro-conjugaison, lors du métabolisme du dextrorphan.

5° - L'élimination urinaire de l'alcaloïde total se révèle quantitativement très importante :

Après 9 h. 2 mg = 8,6 % sur 30 mg injecté

Après 17 h. 6,72mg = 22,4% sur 30 mg injecté

Mais les parts respectives des formes libre et conjuguée sont très contrastées.

Après 9 h.	dextrorphan libre	2,9 % de la dose injectée
	" conjugué	4,62 % " " " "
Après 17 h.	" libre	1,54 % " " " "
	" conjugué	20,85 % " " " "

6° - Dans la bile, la fraction des métabolites du dextrorphan injecté encore présente, se révèle très significative à la fin du processus de conjugaison hépatique et de l'élimination en quelque sorte préparatoire du toxique.

Le prélèvement de la vésicule biliaire effectué 9 h. après l'injection correspondant à une proportion importante du métabolite, 3,42 mg soit 11,4 % de la quantité administrée presque entièrement sous forme conjuguée (10,4 %).

Mais 17 h. après l'administration du dextrorphan, la bile vésiculaire ne contient plus que des traces d'alcaloïde, 0,59 % totalement sous forme conjuguée.

7° - L'élimination intestinale s'est avérée très minime dans nos deux expériences 0,26 % 9 h. après l'injection dont les 2/3 sous forme conjuguée, et 1,93 % après 17 h. dont près des 4/5 sont conjugués.

8° - Le passage du dextrorphan injecté par voie s.c. dans l'estomac est observé ici, comme il l'a été reconnu dans le cas de la morphine, en quantité extrêmement faible après 9 h. : 0,020 mg et en proportion égale pour les formes libre et conjuguée.

9° - La teneur du sang en alcaloïde est aussi très faible après 9 h. Elle est environ trois fois supérieure après 17 h. (0,27 % de la quantité injectée) et totalement conjugué.

10° - Parmi les viscères, pauvres en alcaloïdes, le rein se distingue par la proportion la plus élevée d'alcaloïde total, 70 parties pour million après 9 h. et 185 p.p.m. après 17 h., contre 21 p.p.m. pour le foie après 9 h. et 56 p.p.m. après 17 h.

La relative longueur des opérations analytiques successives qui nous a obligé à un examen plus tardif des viscères, ne nous permet pas de définir les proportions exactes des formes libre et conjuguée au moment du sacrifice de l'animal. Une certaine hydrolyse enzymatique ayant pu se produire dans les viscères, néanmoins, on estime encore une fraction glycuronique supérieure à celle de la forme libre.

11° - Nous avons relevé dans la littérature les travaux de BROSSI et Col. (4 bis) relatifs à l'élimination urinaire par le chien, du dextrorphan injecté par voie s.c. (12 mg/Kg). Le pourcentage d'alcaloïde total éliminé dans les 24 h. évolue entre 6,5 et 14,5 %, les jours suivant l'élimination s'abaissant très rapidement.

Les mêmes auteurs étudiant dans les mêmes conditions le comportement du lévorphane (Dromoran), observent une élimination beaucoup plus faible. Les premières 24 h. entre 1,2 - 1,9 et 3,3 %, variable le 2e jour suivant l'animal respectivement 4,6 - 5,3 et 0,4 %; mais encore sensible au 3e jour.

Ils n'ont pu mettre en évidence des produits d'altération du type Hydroxy-3 morphinan.

Enfin, nous noterons les résultats de FISCHER et LONG concernant l'injection I.M. de racémorphan 10 mg/Kg.

Dans les premières 24 h. l'élimination de l'alcaloïde total est voisine de 14 % dont les 2/3 environ sont sous forme conjuguée.

Dans cette confrontation de nos résultats, nous serions invité à déduire que l'élimination du dérivé lévogyre (analgésique et plus toxique) est lente et minime, tandis que celle de l'antipode dextrorgyre (inactif physiologiquement) est rapide et importante, alors que celle du racémorphan est intermédiaire.

12° - Nous avons cherché des éventuelles analogies dans le métabolisme des principaux alcaloïdes morphinoïdes, tout au moins sous leurs aspects urinaires et biliaires étudiés dans les mêmes conditions.

L'élimination urinaire de la morphine est très rapide chez l'animal normal, atteignant aussi bien dans les expériences de WOODS (20 mg/Kg) que celles de M. et P. CHAMBON (7,5 mg/Kg) après 9 h., 54 % de la quantité injectée dont les 7/10 sont sous forme conjuguée.

Avec le Dilaudid, selon H. CRETIN (2 mg/Kg) la proportion éliminée après 9 h. est beaucoup plus faible, 10,36 % dont les 2/3 sous forme conjuguée. Mais 16 h. après l'injection, cette proportion est très nettement élevée, 24,20 % dont les 9/10 sont à l'état conjugué, rappelant de très près les chiffres que nous avons obtenus avec le dextrorphan.

Quant à l'Eukodal, étudié aussi par H. CRETIN (2 mg/Kg) il ne s'élimine que très lentement dans l'urine au point que après 16 h. on n'en retrouve que 7,13 % de la quantité injectée dont les 7/10 sont à l'état conjugué.

× × ×

Dans la bile, la quantité de morphine retrouvée après 9 h. à très haute concentration correspond à 16 % de la quantité injectée selon WOODS et M. et P. CHAMBON dont plus des 9/10 à l'état conjugué.

L'élimination dans la bile du Dilaudid selon H. CRETIN est après 9 h. voisine de 10 % presque entièrement à l'état conjugué; mais après 16 h. elle semble terminée, et l'alcaloïde résiduel entièrement conjugué ne représente plus que 0,58 %.

Un phénomène du même ordre s'observe avec l'Eukodal dans la vésicule qui, après 16 h. ne renferme que 1,83 % de la quantité injectée entièrement conjuguée.

Il apparaît donc ainsi une analogie assez étroite dans l'allure des éliminations urinaires et biliaires du dextrorphan et du Dilaudid, tant dans le rythme de l'élimination que dans les proportions relatives des formes libre et conjuguée des alcaloïdes. La morphine et l'Eukodal représentent deux positions extrêmes, la première à élimination rapide, le second à élimination retardée.

13° - Envisagée dans l'axe de l'expertise toxicologique après décès, l'élimination biliaire de ces alcaloïdes présente un intérêt très particulier :

1°. Offrir à l'expert une prise d'analyse, la vésicule, facile à isoler, assez résistante et féconde.

2°. Permettre de retrouver des concentrations élevées d'alcaloïde, soit libre, soit surtout conjugué, si le décès est survenu dans les 8 h. après la pénétration du toxique.

3°. Par la mise en évidence et l'isolement même d'un conjugué glycuronique de l'alcaloïde, affirmer le passage de celui-ci dans l'organisme.

La présence des prélèvements biliaires et urinaires parmi les pièces d'expertise, se révèle aussi d'une importance majeure, tant au point de vue de la révélation du toxique alcaloïdique, que de la possibilité de définir approximativement les délais courus entre l'absorption du toxique et le prélèvement ou le décès.

Le Président de la Thèse :

Prof. M. CHAMBRON

Vu et permis d'imprimer,
LYON, le 21 Avril 1964 :

Vu, le Doyen :

J.F. CIER

Le Recteur, Président du
Conseil de l'Université :

R. LOUIS

B I B L I O G R A P H I E

1. AXELROD J. and INSCOE J.K. - Glucuronide formation of narcotic drugs in vitro and in vivo.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. - 103, 675 (1960)
2. BUCHLER H.J., KATZMAN P.A. and DOISY E.A. - Studies on β Glucuronidase from E. COLI.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. - 76, 672 (1951)
3. BECKETT A.H. and CASY A.F. - Synthetic analgesics : stereochemical consideration.
J. Pharm. Pharmacol. - 6, 986, (1954)
4. BRODIE B.B., UDENFRIEND S. and DILL W. - The estimation of basic organic compounds and a technique for the appraisal of specificity.
J. Biol. Chem. - 158, 705, (1945)
- 4 bis. BROSSI A., HAFLIGER O. und SCHNIDER O. - Die Papierchromatographische Bestimmung Von Morphinanderivaten Und Die Verfolgung Ihrer Ausscheidung Beim Hund.
Arzneim. Forsch. - 5, 62, (1955)
5. BENSON W.N., STEFKO P.L. and RANDALL L.O. - Comparative Pharmacology of levorphan, racemorphan and dextrorphan and related methyl-ethers.
J. Pharm. Exptl. Therap. - 109, 189 (1953)
6. BROWN A.K. - Levorphan in anaesthesia.
Brit. Med. J. - 2, 967 (1954)
7. BROWN A.K. - Methorphan as a supplement to nitrous oxide and oxygen anaesthesia.
Brit. Med. J. - 2, 1331 (1952)
8. BOSE Ajay K. - Conformation of alkaloides part II; Morphine
J. Chemistry and Industry - 130, (1954)
9. CHAMBON M. - Considération sur l'altération de certains alcaloïdes au cours de leur extraction par les solvants organiques riches en peroxydes.
IXe Congrès des Sociétés de Pharmacie de France - Clermont-Ferrand (1957)

10. CHAMBON M. et CHAMBON P. - Considérations sur de nouvelles méthodes de recherche de la morphine au cours d'une expertise toxicologique.
Ann. Med. Légale, 41, 35, (1961)
- 10.bis. CRETIN H. - Etude du métabolisme et de l'élimination de l'hydromorphone (Dilaudid) et de la dihydronone (Eukodal).
Thèse Pharmacie n° 504, 18 Fév. 1964 Lyon
11. CHAMBRON M. - Acide glycuronique et glycuro-conjugaison.
Thèse Pharmacie - Lyon 27 avril 1934 - n° 196
12. CHEN-YU SUNG and WAY L. - The metabolic fate of the optical isomers of methadone.
J. Pharm. Exptl. Therap. - 109, 244, (1953)
13. CAVACUTTI P., ROLANDI L. - Un nuovo analgesico disintesi : l'essi-N-methyl-morphinano in anestesia.
L'ospedale Maggiore (Itali) - 374 (1954)
14. CURRERI A.R., GALE J.W., DICKIE H.A. - Affectiveness of Dromoran (3-Hydroxy-N-Methyl-morphinan) as an analgesie in thoracic surgery.
J. Thoracic surgery, - 20, n° 1, 90, (1950)
15. CHEN K.K. - Pharmacology of methadone and related compounds.
Ann. N. Y. Acad. Soc. - 51, 83, (1948)
16. CLARK R.L., PESSOLANO A.A., WEIJLARD J. and PFISTER K. - N-substitued epoxymorphinans.
J. Amer. Chem. Soc. - 75, 4963 (1953)
17. CRAIG. L.C. - A study of the preparation of alpha-pyridyl halides from alpha-aminopyridine by the diazo-reaction.
J. Amer. Chem. Soc. - 56, 231, (1934)
18. DISCHE Z. - A new specific color reaction of hexuronic acid.
J. Biol. Chem. 167, 189, (1947)
19. EDDY Nathan B., M.D. - Chemical structure and action of morphine - like analgesica and related substances.
J. Chemistry and Industry - 1462 (1959)
20. ERBACHER O. - Isolierung Radioaktiver Atomarten.
Angew. Chemie - 59, 6, (1947)
21. EDDY N.B., BESENDORF H. and PELLEMONT B. - The Alcaloide.
Bull. on narcotics - 10, 4, 23, (1958)
22. FISHMAN W.H. and GREEN S. - Microanalysis of glycuronide glucuronic acid as applied to B glucuronidase and glucuronic acid studies.
J. Biol. Chem. - 215, 527, (1955)
23. FISCHER A.L. and LONG J.P. - Absorption and elimination of Dromoran
J. Pharm. Exptl. Therap. - 107, 241, (1953)

24. FISCHER A.L. and LONG J.P. - Levorphan, dextrorphan, racemorphan (Dromoran)
Absorption and excretion of.
J. Pharm. Exptl. Therap. - 107, 241 (1953)
25. FREITWURST F. and AHLEM H.A. - Untersuchungen Über Den Glucuronsäure -
Stoff - Wechsel Beim Menschen Nach Peroraler Und Intravenöser Zufuhr
Naunyn-schmiedeberg's.
Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol. - 217, 382, (1953)
26. FLINTAN P. and KELLE C.A. - Analgesic and other actions of some dithienyl-
butenylamine compounds in man.
Brit. J. Pharm. - 9, 106, (1954)
27. FROMHERZ K. - Pharmacological effects of 3-hydroxy-N-méthyl-morphinan
Arch. Int. Pharmacodyn. - N° 3 - 4 - 85, 387, (1951).
28. FROHMORZ K. und PELLMONT B. - Morphinantagonisten.
Experientia 8, 394, (1952)
29. GREEN A.F. - Analgesic other properties of 3-3-Dithienyl-Alkenyl-Amines
Brit. J. Pharmacol. - 8, 2, (1953)
30. GREWE R. - Synthetische Arzneimittel Mit Morphin - Wirkung.
Angew. Chemie - 59, 194, (1947)
31. GREWE R. - Das Problem Der Morphin - Synthese
Die Naturwissenschaften 33, 333, (1946)
32. GREWE R., MONDON A., NOLTE E. - Die Totalsynthese Des Tetra-hydro-desoxy-
codeins.
Ann. Der. Chemie. 70, 161, (1949)
33. GREWE R. und MONDON A. - Synthesen In der Phenanthren - Reich VI - Mitteil :
Synthese des Morphinans.
Chemische Berichte 81, 279, (1948)
34. GATES M. and TSCHUDI G. - The Synthesis of Morphine.
J. Amer. Chem. Soc. - 74, 1109, (1952)
35. GROSS E.G. and THOMPSON V. - Excretion of combined form of morphin in
tolerant and non tolerant dogs.
J. Pharm. Exptl. Therap. 68, 413, (1940)
36. GLAZE BROOK A.J. - 1-methorphan (1-Dromoran) action and use of.
Brit. Med. J. 2, 1328, (1952)
37. GATES M. and NEWHALL W.F. - The synthesis of ring systems related to mor-
phine. The carbon-nitrogen ring system.
Experientia 5, 282, (1949)
38. HAAS H., HOMAGEN E. und KOLLMANN SPERGER G. - Vergleichende Untersuchungen
Mit Analgetics.
Arzneim Forsch, 3 , 238, (1953)

39. HARASAWA K.
J. Pharm. Soc. Japon - 77, Vol. 2, 168, (1957)
40. - HUGGINS R.A., GRASS W.G. and BRYAN A.R. - Protective action of N-allyl-normorphine against the respiratory depression produced by some compounds related to morphin.
J. Pharm. Exptl. Therap. - 101, 19, (1951)
- HIDELBRANDT F. - Die Intraveöse Morphinuminjektion Ein Diagnostischen Hilfsmittel Zur Lokalisierung Der Krankheit Zentralbl F Chin.
58, 2442, Sept. 26 (1931)
42. HARDY J.D., WOLFF A.G. and GOODELL H. - Studies on pain : measurement of the effect of ethyl alcohol on the pain.
J. Pharm. Exptl. Therap. - 75, 38, (1942)
43. HARNAUCH M., STRAHLENABTEI LUNG DER - Zur Frage Der Schemereberkämpfung Bet Krebserkrankungen Mit Dromoran.
M.M. Wocheimehrift, 4, 164, (1952)
44. HERXHEIMER A. and SANGER C. - Pethidine, Levallorphan mixture analgesic action of.
Brit. Med. J. 2, 802, (1957)
45. ISBELL H. and FRAISER H.F. - Racemorphan (Dromoran) derivatives, activities and addition liabilities of.
J. Pharm. Exptl. Therap. - 6, 432, (1954)
46. ISANU SANO and HARUTOSHI KAJITA
J. Japon Biochem. Soc. (1955)
47. KAISER H. and JORI H.
Arch. Pharm. 87, 963, (1952)
48. KALVODA J., BUCHSCHACHER P. und JEGGER O. - Über Die Absolute Konfiguration Des Morphins Und Verwandter Alkaloide.
Helv. Chim. Acta - 38, 1847, (1955)
49. N.D. LABORATOIRE HOFFMANN-LA-ROCHE
Bâle
50. MECBENBERG H.K., ZEERIEDER R. - Klinische Erfahrungen Mit Dromoran (-)-3-Hydroxy-N-Methyl-Morphinan Tartrat Einem Neuen Synthetischen Analgeticum.
J. Suisse de Med. - 44, 1806, (1951)
51. MUNIER R. - Séparation des alcaloïdes de leurs N-oxydes par microchromatographie sur papier.
Bull. Soc. Chim. Biol. - 35, 1225, (1953)
52. MUNIER R. et MACHEBOEUF M. - Microchromatographie de partage des alcaloïdes et de diverses bases azotées biologiques.
Bull. Soc. Chim. Biol. - 31, 1144, (1949)

53. MAGEMEYER G. - Zur Mehundiung Schmerer Akuter Und Chronischer Sehmerzzus-
tändr In Der Chirurgie.
Die. Med. Welt. - 20, N° 41, 1286, (1954)
54. OGIER J. - Traité de chimie toxicologie
2° Edition - E. Kohn-Abrest (1924)
55. OBERST F.W. - Free and bound morphine in the urine of morphine addicts.
J. Pharmacology - 69, 240, (1940)
56. PLANT O.H. ans PIERCE I.H. - Studies of chronic morphine poisoning in
dogs.
J. Pharm. Exptl. Therap. - 33, 329, (1928)
57. POLONOVSKI M. et POLONOVSKI M. - Sur les aminoxydes des alcaloïdes.
Bull. Soc. Chim. France 1147, (1926)
58. POHLAND A., MARSHAL F.J. and CARNEY T.P. - Optically active compounds
related to methadon.
J. Amer. Chem. Soc. - 71, 460, (1949)
59. PRUDHOMME R.O. - Nouvelle méthode colorimétrique de dosage de la quinine
dans les liquides biologiques.
J. Pharm. et Chim. - I, (9e Série) 8, (1940)
60. QUICK A.J. - The separation of borneol-glycuronic acid and glycuronic
acid.
J. Biol. Chem. 74, 331, (1927)
61. RADOFF L.M. and HUGGINS S.E. - Protective action of N-allyl-normorphine
against demerol.
Proc. Soc Exptl. Biol. N. Y. - 78, 879, (1951)
62. RANDALL L.O. and LEHMANN G. - Analgesic action of 3-hydroxy-N methyl-
morphinan.
J. Pharm. Exptl. Therap. - 99, 163, (1950)
63. REICHLE C., FRIEBEL H. - Zur Hemmung Des Hustenreflexs Durch Zentral
Angreifende Arzneimittel.
Arch. Exptl. Pathologie - 226, 558, (1955)
64. SCHNIDER O. und GRÜSSNER A. - Synthese Von Oxy - Morphinanen.
Helv. Chem. Acta - Vol. 32, Fasc. 3, N° 106, 821, (1949)
65. SCHNIDER O. und GRÜSSNER A. - Oxy-Morphinane - Optisch Aktive 3-oxy-
Morphinane.
Helv. Chim. Acta, 32, 821, (1949)
66. SCHNIDER O. und HELLERBACH J. - Synthese Von Morphinan.
Helv. Chim. Acta - 33, 821, (1949)
67. SCHNIDER O. und HELLERBACH J. - Synthese Von Morphinan.
Helv. Chem. Acta. - Vol. 2, Fasc. 7, (1950)

68. SCHNIDER O., BROSSI A., VOGLER K. - Oxy-Morphinane - Optisch Aktive Benzyl-Octahydro - Isochinoline.
Helv. Chem. Acta - 37, 710, (1954)
69. SCOTT C.C., ROBINEON E.B. and CHEN K.K. - Pharmacologie comparaison of the optical isomers of methadone.
J. Pharmacol. - 93, 282, (1948)
70. SMITH C.C., LEHMANN E.C. and GILFILAN J.L. - Antagonistic action of N-allyl Norporphine upon the analgetic toxic effects of morphine, methadone derivatives and isonipecaine.
Fed. Proc. 10, 335, (1951)
71. STORMONT R.T. and SECRETERY M.D. - Methorphan hydrobromide.
J. Amer. Med. Ass. - 150, 488, (1952)
72. SNEDECOR G.W. - Statistical methods : the Iowa stat college press.
Amer. IOWA. (1946)
73. STANGE H.H. - Erfahrungen In Der SchmerzbeKämpfung Mit Dromoran In Geburtahitte Und Gynäkologie.
Med. Welt. 40, 1250, (1954)
74. STOELTING V.K., THEYE R.A., GRAF J.P. - The use of dromoran (d-1) hydrobromide (3-hydroxy-N methyl-morphinan hydrobromide) for preoperative medication.
Anesthesiology 12 N° 2, 225, (1951)
75. SENNE W. - Therapeutische Erfahrungen Mit Dem Neuen Synthetischen Analgetikum Dromoran.
Die Medizinische 10, 323, (1953)
76. STARKE J. - Uber Die Gurwendungsnrögbehkeit Von Dromoran "EOCHE"
(Tartrat Des Link Drehenden 3 - Oxy - N - Methyl - Morphinan) Ale Analgeticum In Des H. N. O. Herlkunde.
Ars. Medici. (Suisse) - I, 54, (1954)
77. SEIBERT R.A., WILLIAMS C.E. and HUGGINS R.A. - The isolation and identification of "bound" morphine.
Science 120, 222, (1954)
78. SCHAUMANN O. - Uber Eine Neue Klasse Von Verbeindungen Mit Spasmolytischer Und Zentral Analgetischer Wirksamkeit Unter Besonderer Berucksichtigung Des I-Methyl-4-Phenyl-Piperidine-4-Carbousäure äthylesters (Dolantin).
Arch. Exptl. Pathology 196, 109, (1940).
79. SUGIMOTO N. et OHSHIRO S. - Pharm. Bull. Japon -
5, Vol. 4, 316, (1957)
80. SUGIMOTO N. et KUGITA H.
Phar. Bull. Japon - 5, Vol. 4, 378, (1957)
81. SUGIMOTO N. et OENDAL N. -
Pharm. Bull. Japon - 5, Vol. 1, 62, (1957)

82. STOCKLI H.W. and FROMHERZ K.
Helv. Physiol. et Pharmacol. Acta - 3, 335, (1945)
 83. STOELTING V.K., THEYE M.D.R.A. and GRAF P.M.D. - The use of dromoran hydrobromide for preoperation medication.
Anesthesiology - Vol. 12, 2, 225, (1951)
 84. THORP R.H., WALTON E. and OFNER P. - Optical Isomers of amidone, with note on isoamidone.
Nature, London, 160, 605, (1947)
 85. TOLLENS B. and RORIVE F. - Uber Farben Und Spektralreaction Der Zuckerarten Mit Naphtoresorcinol Und Salzsäure.
Ber. Chem. Ges. 41, 1783, (1908)
 86. TULLAR B.F., WETTERAU W. and ARCHER S. - The resolution of ethyl-I-I-diphenyl-3-dimethylaminobutyl sulfone.
J. Amer. Chem. Soc. 70, 3959, (1948)
 87. UNNA K. - Antagonistic effect of N-allyl-normorphine upon morphine.
J. Pharm. Pharmacol. 79, 27 (1943)
 88. VIDIC E. - Die Anwendung Papierchromatographischer Methoden Beim Forensischen Sucht Mittel - Nachweid.
Arzneim Forsch, 5, 291, (1955)
 89. WOODS L.A. - Distribution and fate of morphine in tolerant and non tolerant dogs and rats.
J. Pharm. Exptl. Therap. 112, 158, (1954)
 90. WAY E.L. and SUNG C.Y. - Tissue distribution and excretion of d- and of l-methadone.
Fed. Proc. II, 401, (1952)
 91. WENDE S. - Alkaloides - Sucht - Diagnostik Und Alkaloides Sucht-Verhinderung Mit Opiat-Antagonisten.
Zbl. Fur Ges. Neurologie Psychiatrie. 148, 6, (1958)
 92. Zellulosepulver N° 123 Fur Die Saulem Chromatographie
Carl Schleicher et Schüll - Bassel / Kr. Einbeck
 93. ZAGER L.L. and others - Observations on use new analgesic, Nu - 2206 (3-hydroxy-N-methyl-morphinan hydrobromide).
J. Lab. and Clin. Med. - 34, 1530 (1949)
 94. ZAUDER H.L. - The effect of prolonged morphine administration on the vivo and in vitro conjugation of morphine by rats.
J. Pharm. Exptl. Therap. - 104, II, (1952)
-

TABLE DES MATIERES

	page
INTRODUCTION	1
HISTORIQUE	3
PREMIERE PARTIE : GENERALITES ET TRAVAUX ANTERIEURS	5
Chapitre I : Synthèse de GREWE	5
" de SCHNIDER et GRUSSNER	9
Obtention des antipodes optiques	12
Chapitre II : Propriétés physico-chimiques	13
" pharmacodynamiques	14
Chapitre III : Constitution et activité	19
Chapitre IV : Considérations stéréochimiques	21
Chapitre V : Caractérisation et dosage	24
Chapitre VI : Métabolisme	29
Chapitre VII : Indications	38
DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS	
Chapitre I : Méthodes de dosage	41
I - Méthode de M. et P. CHAMBON	41
II-- Méthode de STAS-OTTO-OGIER et KOHN-ABREST	46
Chapitre II : Expérimentation animale	48
A - Dosage de l'hydroxy-3 N-méthyl-morphinan chez le chien N° I	48
B - Dosage de l'hydroxy-3 N-méthyl-morphinan chez le chien n° II	50
C - Identification de l'hydroxy-3 N-méthyl-morphinan chez les chiens N° I et II dans les urines et la bile	52
D - Identification des dérivés de conjugaison du dextrophan dans les urines	55
Chapitre III : Hydrolyse de la forme conjuguée par la B Glycuronidase	61
DISCUSSION	65
CONCLUSIONS	73
BIBLIOGRAPHIE	79

